SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-051831- -00000-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085406- -00005-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 242

Industria y
SUPERINTE

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN DIVISIONAL EXPEDIENTE 11-085.406

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO:** **POLIPÉPTIDOS PH20 SOLUBLES EXTENDIDOS Y USOS DE LOS MISMOS**

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** **C12N 9/26**

71. **SOLICITANTE:** **HALOZYME, INC.**

DOMICILIO: **California, Estados Unidos de América**

74. **APODERADA** **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**

22. **BOGOTÁ, D.C.**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-051831- -00000-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085406- -00005-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 242

DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FU

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídic ☒

HALOZYME, INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	11388 Sorrento Valley Road San Diego,	California 92121

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ . **C.C. 22.468.787** **147463 CSJ**
Apellidos y Nombre **Documento de identificación** **Tarjeta profesional**

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-2949

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente **11-085.406** De: _____ A: _____	Expediente_____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	
Nombre y apellidos	**Firma**
C.C. 22.468.787	**Tarjeta Profesional T.P. 147463 CSJ**

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad Capitulo II
2	**DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)**		
	Solicitud Internacional No.	**PCT/US2009/006501**	**Fecha** **09 Diciembre de 2009**
	Publicación Internacional No.	**WO 2010/077297 A1**	**Fecha** **08 de Julio de 2010**
3	**TÍTULO DE LA INVENCIÓN** (200 caracteres o espacios máximos)		
	POLIPÉPTIDOS PH20 SOLUBLES EXTENDIDOS Y USOS DE LOS MISMOS		
4	**CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 9/26**		
5	**SOLICITANTE (S)** ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
HALOZYME, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN: **11388 Sorrento Valley Road San Diego,** No. TELÉFONO:

CIUDAD: **California 92121,** CORREO ELECTRONICO:

PAÍS DE RESIDENCIA: **Estados Unidos de América** LUGAR DE CONSTITUCIÓN: **Estados Unidos de América**

7 INVENTOR (ES) **VER HOJA INFORMACION COMPLEMENTARIA**

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

DIRECCIÓN	CIUDAD	ESTADO	PAÍS RESIDENCIA

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ	**SILVANA MARIA**	**C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ**

DIRECCIÓN **Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6** No. TELÉFONO **6181088**

CIUDAD **Bogotá, D.C.** CORREO ELECTRÓNICO **notificaciones@clarkemodet.com.co.**

PAÍS **Colombia**

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
1.Estados Unidos de América	**US**	**61/201.384**	**2008/12/09**
2.Estados Unidos de América	**US**	**61/281.240**	**2009/11/13**

2

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	☐
Universidades públicas o privadas	☐
Entidades sin ánimo de lucro	☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-018313// 14-025197	Fecha 17/02/2014 06/03/2014

16	FIRMA DEL APODERADO :

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios 223
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 20
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios:6
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

ANEXO

INVENTORES

1.) **WEI, Ge**

(11530 Miro Circle, San Diego, California 92131, Estados Unidos de América);

2.) **PANNEERSELVAM, Krishnasamy**

(14917 Morningside Drive, Poway, California 92064, Estados Unidos de América);

3.) **FROST, Gregory, I.**

(13662 Mercado Drive, Del Mar, California 92014, Estados Unidos de América);

4.) **BOOKBINDER, Louis**

(14823 Gable Ridge Road, San Diego, California 98128, Estados Unidos de América).

POLIPÉPTIDOS PH20 SOLUBLES EXTENDIDOS Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan polipéptidos PH20 solubles, incluyendo polipéptidos PH20 solubles extendidos, y usos de los mismos. También se proporcionan otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C y polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados y usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El hialuronano (ácido hialurónico; HA) es un polipéptido que se encuentra en la matriz extracelular de muchas células especialmente en tejido conectivo suave. El HA también se encuentra predominantemente en la piel, cartílago, y en fluido sinovial en mamíferos. El hialuronano también es el constituyente principal del humor vítreo del ojo. El HA tiene un papel en varios procesos fisiológicos, tal como en homeostasis de proteína en agua y plasma (Laurent TC et al (1992) *FASEB J* 6: 2397-2404). Ciertas enfermedades se asocian con la expresión y/o producción de hialuronano. Las hialuronidasas son enzimas que degradan hialuronano. Al catalizar HA, hialuronidasas pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos asociados con acumulación de HA u otros glicosaminoglicanos. También, ya que HA es un componente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa incrementa la permeabilidad de tejido y por lo tanto puede usarse para incrementar la dispersión y suministro de agentes terapéuticos. Varias hialuronidasas se han usado terapéuticamente (por ejemplo Hydase™, Vitrase™ y Wydase™), típicamente como agentes dispersantes y de extensión en combinación con otros agentes terapéuticos. Muchos de estos son formas ovinas o bovinas, que pueden ser inmunogénicas para tratamiento de humanos. Se necesitan composiciones mejoradas de hialuronidasas que puedan usarse para el tratamiento.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 solubles, incluyendo polipéptidos PH20 solubles extendidos (esPH20), y composiciones. Los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente son proteínas solubles que están truncadas en el C terminal e incluyen aquellas que carecen de toda la secuencia de señal de enlace de ancla GPI (por ejemplo están truncados en las posiciones de aminoácido 450 hasta 490). Los polipéptidos PH20 solubles también incluyen polipéptidos PH20 solubles extendidos que mantienen uno o más residuos localizados en la secuencia de señal de enlace de ancla GPI del correspondiente polipéptido PH20 de tipo natural de longitud completa. También se proporcionan en la presente otros polipéptidos PH20 modificados que contienen truncamientos en el C terminal. También se proporcionan las formas parcialmente desglicosiladas de cualquiera de los polipéptidos. También se proporcionan métodos de tratamiento usando los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente.

Se proporcionan en la presente hialuronidasas PH20 solubles extendidas sustancialmente purificadas aisladas (esPH20), que pueden N-glicosilarse o N-glicosilarse parcialmente. En algunos ejemplos, el polipéptido esPH20 N-glicosilado parcialmente contiene al menos una porción de N-acetilglucosamina ligada a cada una de al menos dos porciones ligadas a N, tal como, por ejemplo, residuos de aminoácidos 368 y 393 de la SEQ ID NO:107 o residuos que corresponden a residuos de aminoácidos 368 y 393 de la SEQ ID NO:107. En algunos aspectos, el polipéptido esPH20 N-glicosilado parcialmente contiene al menos dos porciones N-acetilglucosamina ligadas a cada una de al menos dos porciones ligadas a N. El polipéptido esPH20 N-glicosilado parcialmente proporcionado en la presente también puede contener un azúcar ramificado.

Se proporcionan en la presente polipéptidos esPH20 que tienen la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS:

5

60-63 y 102-104 o una variante alélica o de especie de las mismas. También se proporcionan variantes de polipéptidos esPH20 que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104 y mantiene al menos 30% de la actividad de hialuronidasa de la correspondiente forma no modificada o de un polipéptido que se codifica por un ácido nucleico que codifica un polipéptido con aminoácidos 36-482 de la SEQ ID NO: 107. Tales polipéptidos esPH20 permanecen solubles y activos neutros. En un ejemplo, el esPH20 es un esPH20 humano, tal como uno con una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104, o un chimpancé esPH20, tal como uno con una secuencia de aminoácidos establecida como aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 o 36-498 de la SEQ ID NO:197.

También se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 sustancialmente purificados. Estos polipéptidos PH20 pueden tener una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 55-63 y 64-95 o una variante alélica o de especie de las mismas. En otros ejemplos, los polipéptidos PH20 son variantes que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 55-63 y 64-95, que mantienen al menos 30% de la actividad de hialuronidasa de la correspondiente forma no modificada o de un polipéptido que se codifica por un ácido nucleico que codifica un polipéptido con aminoácidos 36-482 de la SEQ ID NO:107. Tales polipéptidos PH20 son activos neutros.

Los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente pueden ser N-glicosilados o N-glicosilados parcialmente. En algunos ejemplos, el polipéptido esPH20 N-glicosilado parcialmente contiene al menos una porción de N-acetilglucosamina ligada a cada una de al menos dos porciones ligadas a N, tal como, por ejemplo, residuos de aminoácidos

6

368 y 393 de la SEQ ID NO: 107 o residuos que corresponden a residuos de aminoácidos 368 y 393 de la SEQ ID NO:107. En algunos aspectos, el polipéptido PH20 parcialmente N glicosilado contiene al menos dos porciones N-acetilglucosamina ligadas a cada una de al menos dos porciones ligadas a N. Los polipéptidos PH20 parcialmente N glicosilados proporcionados en la presente también pueden contener un azúcar ramificado. En algunos aspectos, los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente son solubles, y se pueden seleccionar de entre PH20 de humano, chimpancé, mono rhesus, mono cinomolgo, ratón, conejo, conejillo de indias, vaca u oveja.

Los polipéptidos esPH20 y PH20 proporcionados en la presente se pueden modificar por, por ejemplo, silación, albúminación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación o fosforilación. En algunos aspectos, los polipéptidos esPH20 y PH20 se modifican por un polímero, tal como dextrano o PEG. También se proporcionan en la presente, conjugados que contienen los polipéptidos esPH20 o PH20. Los conjugados ejemplares incluyen aquellos en los cuales el esPH20 o PH20 se conjuga a un dominio de multimerización (tal como un dominio Fc), toxina, etiqueta detectable o fármaco.

Se proporcionan en la presente ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos esPH20 y PH20 descritos arriba y proporcionados en la presente. Estos ácidos nucleicos incluyen aquellos que codifican un polipéptido esPH20 o PH20 con aminoácidos que corresponden a aminoácidos 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 o 36-497 de la SEQ ID NO:107, y aquellos que codifican un esPH20 con aminoácidos que corresponden a aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 o 36-498 de la SEQ ID NO: 197. También se proporcionan en la presente vectores que contienen estos ácidos nucleicos y células que contienen los vectores, tal como

7

células CHO.

Se proporcionan en la presente composiciones que contienen alguno o más de los polipéptidos esPH20 o PH20 descritos en la presente. En algunos ejemplos, las composiciones contienen una pluralidad de polipéptidos esPH20 o PH20. Por ejemplo, las composiciones pueden contener una pluralidad de polipéptidos esPH20 que se codifican por una molécula de ácido nucleico que codifica aminoácidos que corresponden a aminoácidos 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 o 36-497 de la SEQ ID NO: 107, y aquellos que codifican un esPH20 con aminoácidos que corresponden a aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 o 36-498 de la SEQ ID NO:197. En algunos ejemplos, las composiciones contienen polipéptidos esPH20 o PH20 que se secretan de células CHO.

Las composiciones proporcionadas en la presente pueden ser composiciones farmacéuticas. En algunos ejemplos, las composiciones contienen un agente terapéutico adicional, que se puede formular con la composición o en una composición separada. Ejemplar de los agentes terapéuticos que se pueden incluir en las composiciones proporcionadas en la presente son agentes quimioterapéuticos, agentes analgésicos, agentes anti-inflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes amebicidas, agentes para tricomonas, agentes anti-Parkinson, agentes anti-palúdico, agentes anticonvulsivos, agentes anti-depresivos, agentes anti-artríticos, agentes anti-hongos, agentes antihipertensivos, agentes antipiréticos, agentes anti-parásitos, agentes antihistaminas, agentes alfa-adrenérgicos agonistas, agentes bloqueadores alfa, agentes anestésicos, agentes dilatadores bronquiales, agentes biocidas, agentes bactericidas, agentes bacteriostáticos, agentes bloqueadores beta adrenérgicos, agentes bloqueadores del canal de calcio, agentes de fármaco cardiovascular,

agentes anticonceptivos, agentes decongestionantes, agentes diuréticos, agentes depresivos, agentes diagnósticos, agentes de electrolitos, agentes hipnóticos, agentes de hormona, agentes hiperglicémicos, agentes relajantes musculares, agentes del contratante del músculo, agentes oftálmicos, agentes parasimpatomiméticos, agentes de energizador psíquico, agentes sedantes, agentes simpatomiméticos, agentes tranquilizantes, agentes urinarios, agentes vaginales, agentes viricidas, agentes de vitamina, agentes anti-inflamatorios no esteroidales, agentes del inhibidor de enzima que convierte angiotensina, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, moléculas orgánicas e inductores del sueño. En ejemplos particulares, el agente terapéutico es un anticuerpo, una inmunoglobulina, un biofosfato (tal como ácido zolentrónico), una citoquina, una agente quimioterapéutico o una insulina (tal como una insulina de acción rápida).

Otros agentes terapéuticos que se pueden incluir en las composiciones proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, Activicinas; Aclarubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleuquinas; Alemtuzumabs; Alitretinoinas (Ácidos 9-Cis-Retinoico); Allopurinoles; Altretaminas; Alvocidibs; Ambazonas; Ambomicinas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidas; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxirones; Ancitabinas; Antramicinas; Apaziquonas; Argimesnas; Trióxidos Arsénicos; Asparaginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastatos; BCG Vivo; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexarotenos; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodars; Bisantrenos; Bisantrenos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomibs; Brequinars; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinibs; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetimeros; Carboplatinas; Carboquonas; Carmofuros; Carmustinas con Polifeprosanos; Carmustinas; Carubicinas;

Carzelesinas; Cedefingolos; Celecoxibs; Cemadotinas; Clorambucilos; Citronelas; Cirolemicinas; Cisplatinas; Cladribinas; Clanfenuros; Clofarabinas; Crisnatolos; Ciclofosfamidas; liposomales de Citarabina; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Alfas Darbepoetina; liposomales de Daunorubicina; Daunorubicinas/Daunomicinas; Daunorubicinas; Decitabinas; Denileuquina Diftitoxas; Dexniguldipinas; Dexonaplatinas; Dexrazoxanos; Dezaguaninas; Diaziquonas; Dibrospidiums; Dienogestos; Dinalinas; Disermolidas; Docetaxeles; Dofequidars; Doxifluridinas; liposomales de Doxorubicina; HCL Doxorubicina; inyección de liposoma de HCL Docorubicina; Doxorubicinas; Droloxifenos; Propionatos de Dromostanolona; Duazomicinas; Ecomustinas; Edatrexatos; Edotecarinas; Eflornitinas; Elacridars; Elinafidas; Soluciones B de Elliott; Elsamitrucinas; Emitefuros; Enloplatinas; Enpromatos; Enzastaurinas; Epipropidinas; Epirubicinas; alfas Epoetina; Eptaloprosts; Erbulozoles; Esorubicinas; Estramustinas; Etanidazoles; Etoglucidas; fosfatos de Etopósido; Etopósidos VP-16; Etopósidos; Etoprinas; Exemestanos; Exisulinds; Fadrozoles; Fazarabinas; Fenretinidas; Filgrastims; Floxuridinas; Fludarabinas; Fluorouracilos; 5-fluorouracilos; Fluoximesteronas; Flurocitabinas; Fosquidonas; Fostriecinas; Fostriecinas; Fotretaminas; Fulvestrants; Galarubicinas; Galocitabinas; Gemcitabinas; Gemtuzumabs/Ozogamicinas; Geroquinoles; Gimatecanos; Gimeracilos; Gloxazonas; Glufosfamidas; Goserelin acetatos; Hidroxiureas; Ibritumomabs/Tiuxetanos; Idarubicinas; Ifosfamidas; Ilmofosinas; Ilomastatos; Imatinib mesilatos; Imexonas; Improsulfanos; Indisulams; Inproquonas; Interferones alfa-2a; Interferones alfa-2b; Interferones Alfa; Interferones Beta; Interferones Gamma; Interferones; Interleuquina-2s y otras Interleuquinas (incluyendo Interleuquinas recombinantes); Intoplicinas; Iobenguanos [131-I]; Iproplatinas; Irinotecanos; Irsogladinas; Ixabepilonas; Cetotrexatos; L-Alanosinas; Lanreotidas; Lapatinibs; Ledoxantronas; Letrozoles; Leucovorinas; Leuprolides; Leuprorelinas

(Leuprorelides); Levamisoles; Lexacalcitoles; Liarozoles; Lobaplatinas; Lometrexoles; Lomustinas/CCNUs; Lomustinas; Lonafarnibs; Losoxantronas; Lurtotecanos; Mafosfamidas; Manosulfanos; Marimastatos; Masoprocoles; Maytansinas; Mecloretaminas; mostazas de Mecloretaminas/Nitrógeno; acetatos de Megestrol; Megestroles; Melengestroles; Melfalanos; Melfalanos IL-PAMs; Menogarilos; Mepitiostanos; Mercaptopurinas; 6-Mecaptopurina; Mesnas; Metesinds; Metotrexatos; Metoxsalens; Metomidatos; Metoprinas; Meturedepas; Miboplatinas; Miproxifenos; Misonidazoles; Mitindomidas; Mitocarcinas; Mitocrominas; Mitoflaxonas; Mitogilinas; Mitoguazonas; Mitomalcinas; Mitomicinas C; Mitomicinas; Mitonafidas; Mitoquidonas; Mitosperos; Mitotanos; Mitoxantronas; Mitozolomidas; Mivobulinas; Mizoribinas; Mofarotenos; Mopidamoles; Mubritinibas; Ácidos Micofenólicos; Fenpropionatos de Nandrolona; Nedaplatinas; Nelzarabinas; Nemorubicinas; Nitracrinas; Nocodazoles; Nofetumomabs; Nogalamicinas; Nolatrexeds; Nortopixantronas; Octreotidos; Oprelvequinas; Ormaplatinas; Ortataxels; Oteracilos; Oxaliplatinas; Oxisuranos; Oxofenarsinas; Paclitaxeles; Pamidronatos; Patubilonas; Pegademasas; Pegaspargasas; Pegfilgrastims; Peldesinas; Peliomicinas; Pelitrexoles; Pemetrexeds; Pentamustinas; Pentostatinas; Peplomicinas; Perfosfamidas; Perifosinas; Picoplatinas; Pinafidas; Pipobromanos; Piposulfanos; Pirfenidonas; Piroxantronas; Pixantronas; Plevitrexeds; Mitramicinas de Plicamicid; Plicamicinas; Plomestanos; Plomestanos; Porfímeros sodio; Porfimeros; Porfiromicinas; Prednimustinas; Procarbazinas; Propamidinas; Prospidiums; Pumitepas; Puromicinas; Pirazofurinas; Quinacrinas; Ranimustinas; Rasburicasos; Riboprinas; Ritrosulfanos; Rituximabs; Rogletimidas; Roquinimexs; Rufocromomicinas; Sabarubicinas; Safingols; Sargramostims; Satraplatinas; Sebriplatinas; Semustinas; Simtrazenos; Sizofiranos; Sobuzoxanos; Sorafenibs; Sparfosatos; Ácidos Esparfósicos; Eesparsomicinas; Espirogermanios; Espiromustinas; Espiroplatinas; Espiroplatinas; Escualaminas; Estreptonigrinas; Estreptovaricinas;

Estreptozocinas; Sufosfamidas; Sulofenuros; Malato de Sunitinib; 6-TG; Tacedinalinas; Talcos; Talisomicinas; Tallimustinas; Tamoxifenos; Tariquidars; Tauromustinas; Tecogalans; Tegafuros; Teloxantronas; Temoporfinas; Temozolomidas; Teniposidas/VM-26s; Tenipósidos; Teroxironas; Testolactonas; Tiamiprinas; Tioguaninas; Tiotepas; Tiamiprinas; Tiazofurinas; Tilomisoles; Tiloronas; Timcodars; Timonacics; Tirapazaminas; Topixantronas; Topotecanos; Toremifenos; Tositumomabs; Trabectedinas (Ecteinascidina 743); Trastuzumabs; Trestolonas; Tretinoinas/ATRA; Triciribinas; Trilostanos; Trimetrexatos; Triplatina Tetranitratos; Triptorelinas; Trofosfamidas; Tubulozoles; Ubenimexs; Mostazas de Uracilo; Uredepas; Valrubicinas; Valspodars; Vapreotidas; Verteporfinas; Vinblastinas; Vincristinas; Vindesinas; Vinepidinas; Vinfluninas; Vinformidas; Vinglicinatos; Vinleucinoles; Vinleurosinas; Vinorelbinas; Vinrosidinas; Vintriptoles; Vinzolidinas; Vorozoles; Xantomicinas A (Guameciclinas); Zeniplatinas; Zilascorbs [2-H]; Zinoestatinas; Zoledronato; Zorubicinas; y Zosuquidars.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar una enfermedad o afección asociada con hialuronano, en donde a un sujeto se le administra un esPH20 o PH20, o una composición que contienen un esPH20 o PH20, proporcionados y descritos en la presente. También se proporcionan métodos para tratar un exceso de glicosaminoglicanos; para tratar un tumor; para tratar acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro; para tratar un trastorno cardiovascular; para tratar un trastorno oftálmico; para tratar enfermedad pulmonar; para incrementar la penetración de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos; para tratar celulitis; o para incrementar biodisponibilidad de fármacos y otros agentes terapéuticos. Tales métodos implican administrar a un sujeto cualquiera de los polipéptidos esPH20 o PH20 o composiciones descritas en la presente.

Los polipéptidos esPH20 y PH20 proporcionados en la presente se

12

pueden usar en lugar de una hialuronidasa PH20, solo o en combinación, en cualquier método de tratamiento o terapia de combinación para la cual una hialuronidasa PH20 se usa en la Publicación de E.U.A. Nos. US20040268425, US20050260186, y US20060104968; y Solicitud de E.U.A. Nos. de Serie 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 and 12/386,222.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa una alineación de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos PH20 de humano (SEQ ID NO: 107) y de chimpancé (SEQ ID NO: 197) (realizada usando el programa de alineación ClustalW2). Los residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace GPI-ancla de PH20 humano, y los aminoácidos correspondientes en la secuencia de PH20 chimpancé, están en negritas y subrayados. "*" indica que los residuos anteriores son idénticos en ambas secuencias en la alineación. ":" indica sustituciones conservadas, y "." indica sustituciones semi-conservadas.

La Figura 2 representa los tipos principales de N-glicanos en vertebrados, incluyendo glicanos de alta manosa, glicanos de híbrido y glicanos complejos.

Las Figuras 3A-3D representan los sitios de escisión de endoglicosidasa. La Figura 3A ilustra los sitios de escisión para Endoglicosidasa F1 y Péptido N Glicosidasa F (PNGaseF). La Figura 3B ilustra los sitios de escisión para Endoglicosidasa F2 y PNGaseF. La Figura 3C ilustra los sitios de escisión para Endoglicosidasa F3 y PNGaseF. La Figura 3D ilustra los sitios de escisión para Endoglicosidasa F4 y PNGaseF.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Información General

A. Definiciones

B. Información general

13

1. PH20

a. Glicosilación

b. Anclaje de GPI

C. Polipéptidos PH20 Solubles Extendidos

1. Polipéptidos esPH20 humanos

2. Otras especies de polipéptidos esPH20

D. Polipéptidos PH20 parcialmente N glicosilados

1. polipéptidos PH20

2. Polipéptidos PH20 terminalmente C truncados

3. Modificaciones adicionales

Conjugación a polímeros

E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos Que Codifican Hialuronidasas PH20 Soluble Extendidas y otras PH20 Solubles, y Polipéptidos De los Mismos

1. Vectores y Células

2. Expresión

a. Células Procarióticas

b. Células de Levadura

c. Células de Insecto

d. Células de Mamífero

e. Plantas

3. Técnicas de Purificación

F. Preparación, Formulación y Administración de Polipéptidos PH20 Solubles Extendidos, y Otros Polipéptidos PH20 Solubles

1. Inyectables, soluciones y emulsiones

Polvos Liofilizados

2. Administración Tópica

3. Composiciones para Otras Vías de Administración

4. Dosificación y Administración

5. Empaquetado, Artículos de Fabricación y Kits

G. Ensayos

1. Actividad de Hialuronidasa

2. Solubilidad

H. Métodos de Tratamiento y Usos de PH20 Soluble Extendido y otros PH20 Solubles y Terapia de Combinación

1. Uso como un Agente de Difusión y Terapia de Combinación

2. Uso para remover Exceso de Glicosaminoglicanasas

a. Uso en tratamiento de cáncer

b. Uso en tratamiento de acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro

c. Uso en tratamiento de acumulación de glicosaminoglicano en enfermedad cardiovascular

d. Uso en vitrectomía y trastornos y afecciones oftálmicos

e. Uso en hipodermoclisis

f. Uso en terapia génica

g. Usos cosméticos

h. Uso en transplante de órganos

i. Uso en enfermedad pulmonar

3. Otros usos

I. 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 como se entiende comúnmente por alguien de experiencia en la técnica a la cual la invención pertenece. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias del Genbank, bases de datos, sitios web y otros materiales publicados refiriéndose en todas partes en la presente a la descripción completa, a menos que se anote de otra manera, se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para términos en la presente, esos en esta sección prevalecen. Cuando se hace referencia a

un URL u otros, como identificador o dirección, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y la información particular en el internet puede ir y venir, pero la información equivalente se puede encontrar buscando en Internet. La referencia a ello evidencia la disponibilidad y diseminación pública de tal información.

Como se usa en la presente, hialuronidasa se refiere a una clase de enzimas que degradan hialuronano. Las hialuronidasas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos (EC 3.2.1.36), y hialuronidasas tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas incluyen cualquiera de origen no humano que incluye, pero no se limita a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, piscino, ranino, bacteriano, y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, y PH20 (SEQ ID NO: 107). También incluidas entre las hialuronidasas son las hialuronidasas solubles, incluyendo, PH20 ovino y bovino, PH20 humano soluble y rHuPH20. Ejemplos de hialuronidasas solubles de bovino u ovino comercialmente disponibles son hialuronidasa Vitrase® (hialuronidasa de ovino) y hialuronidasa Amphadase® (hialuronidasa de bovino).

Como se usa en la presente, PH20 se refiere a un tipo de hialuronidasa que ocurre en esperma y es activo neutro. PH-20 ocurre en la superficie del esperma, y en el acrosoma derivado de lisosoma, donde se enlaza a la membrana acrosomal interna. El PH20 incluye aquellos de cualquier origen incluyendo, pero no se limita a, origen humano, chimpancé, Mono cinomolgo, Mono rhesus, murino, bovino, ovino, conejillo de indias, conejo y rata. Los polipéptidos PH20 ejemplares incluyen aquellos de humano (SEQ ID NO: 107), chimpancé (SEQ ID NO: 197), Mono rhesus (SEQ ID NO: 198), Mono cinomolgo (SEQ ID NO: 114), vaca (por ejemplo, SEQ ID NOS: 111 y 119); ratón (SEQ ID NO: 117); rata (SEQ ID NO: 116); conejo (SEQ ID NO: 112); oveja (SEQ ID NOS: 113, 118

y 120) y conejillo de indias (SEQ ID NO: 115). La referencia a PH20 incluye polipéptidos PH20 precursores y polipéptidos PH20 maduros (tales como aquellos en los cuales una secuencia de señal se ha removido), las formas truncadas de los mismos que tienen actividad, e incluyen variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a los polipéptidos precursores establecidos en la SEQ ID NO: 107 y 109, o las formas maduras de los mismos. Los polipéptidos PH20 también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas y postraduccionales y aquellos que no contienen modificaciones químicas y postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albúminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptido conocidas en la técnica. Una hialuronidasa PH20 truncada es cualquier forma acortada de terminal C de los mismos, particularmente formas que están truncadas y activas neutrales cuando se N glicosilan.

Como se usa en la presente, un PH20 soluble se refiere a cualquier forma de PH20 que es soluble bajo condiciones fisiológicas. Un PH20 soluble se puede identificar, por ejemplo, por su división en la fase acuosa de una solución de Triton® X-114 a 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1604-7). PH20 anclado de membrana, tal como PH20 anclado de lípido, incluyendo PH20 anclado de GPI, se dividirá dentro de la fase de enriquecida de detergente, pero se dividirá dentro la fase pobre de detergente o acuosa después del tratamiento con Fosfolipasa-C. Incluidos entre PH20 soluble está el PH20 anclado de membrana en el cual una o más regiones asociadas con anclaje del PH20 a la membrana se ha removido o modificado, donde la forma soluble conserva la actividad de hialuronidasa. El PH20 soluble también incluye PH20 soluble recombinante y aquellos contenidos en o purificados de

17

fuentes naturales, tal como, por ejemplo, extractos de testículos de oveja o vacas. Ejemplar de tal PH20 soluble es PH20 humano soluble.

Como se usa en la presente, PH20 humano soluble o sHuPH20 incluye polipéptidos PH20 que carecen de todo o una parte de la secuencia de ancla de glicosilfospatidilinositol (GPI) en el C terminal de tal manera que en la expresión, los polipéptidos son solubles bajo condiciones fisiológicas. La solubilidad se puede evaluar por cualquier método adecuado que demuestra la solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Ejemplar de tales métodos es el ensayo Triton® X-114, que evalua la división en la fase acuosa y que se describe arriba y en los ejemplos. Además, un PH20 polipéptido humano soluble es, si se produce en células CHO, tal como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos PH20 humanos solubles, sin embargo, no se limitan a aquellos producidos en células CHO, pero se pueden producir en cualquier célula o por cualquier método, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptido. La referencia a la secreción en células CHO es definitoria. Por consiguiente, si un polipéptido pudiera expresarse y secretarse en células CHO y es soluble, esto es, *se* divide en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido PH20 soluble ya sea que se produzca o no de esa manera. Los polipéptidos precursores para polipéptidos sHuPH20 pueden incluir una secuencia de señal, tal como una secuencia de señal heteróloga o no heteróloga (esto es, nativa). Ejemplar de los precursores son aquellos que incluyen una secuencia de señal, tal como la secuencia de señal de aminoácido 35 nativa en las posiciones de aminoácido 1-35 (ver, por ejemplo, aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO: 107).

Como se usa en la presente, un "PH20 soluble extendido" o "esPH20" incluye polipéptidos PH20 solubles que contienen residuos hasta la secuencia de señal de enlace de ancla GPI y uno o más residuos contiguos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI tal que el

esPH20 es soluble bajo condiciones fisiológicas. La solubilidad bajo condiciones fisiológicas se puede determinar por cualquier método conocido por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar por el ensayo Triton® X-114 descrito arriba y en los ejemplos. Además, como se discute arriba, un PH20 soluble es, si se produce en células CHO, tal como células CHO-S, un polipéptido que se expresa y se secreta en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos PH20 humanos solubles, sin embargo, no se limitan a aquellos producidos en células CHO, pero se pueden producir en cualquier célula o por cualquier método, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptido. La referencia a la secreción en células CHO es definitoria. Por consiguiente, si un polipéptido se podría expresar y secretar en células CHO y es soluble, esto es, divisiones en la fase acuosa cuando se extrae con Triton® X-114, es un polipéptido PH20 soluble ya sea que se produzca o no de esa manera. Los polipéptidos esPH20 solubles humanos incluyen, además de los residuos 36-490, uno o más aminoácidos contiguos de posición 491 de residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 107, inclusive, de manera que el polipéptido resultante es soluble. Los polipéptidos solubles esPH20 humanos ejemplares son aquellos que tienen residuos de aminoácidos que corresponden a aminoácidos 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 y 36-497 de la SEQ ID NO: 107. Ejemplar de estos son aquellos con una secuencia de aminoácido establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104. También incluidas son variantes alélicas y otras variantes, tal como cualquiera con 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor de identidad de secuencia con los polipéptidos correspondientes de SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104 que mantienen actividad neutral y son solubles. La referencia a identidad de secuencia se refiere a variantes con sustituciones de aminoácido.

Como se usa en la presente, la referencia a esPH20s incluye

polipéptidos precursores esPH20 y polipéptidos esPH20 maduros (tal como aquellos en los cuales una secuencia de señal se ha removido), formas truncadas de los mismos que tienen actividad enzimática (manteniendo al menos 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más de la forma de longitud completa) y son solubles, e incluyen variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a los polipéptidos precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 107 y 109, o las formas maduras de los mismos.

Como se usa en la presente, la referencia a esPH20s también incluye aquellas que contienen modificaciones químicas y postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas y postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación, albúminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptido conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente, PH20 humano recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humano que es expresado recombinantemente y secretado en células de Ovario de Hámster Chino (CHO por sus siglas en ingles). El rHuPH20 soluble se codifica por ácido nucleico que incluye la secuencia de señal y se establece en la SEQ ID NO: 109. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de los mismos y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Como se produce en el medio de cultivo, hay heterogeneidad en el C terminal de manera que el producto incluye una mezcla de especies que puede incluir una o más de la SEQ ID NO: 122 hasta SEQ ID NO: 127 en diversas abundancias.

Similarmente, para otras formas de PH20, tal como los esPH20,

polipéptidos expresados recombinantemente y composiciones de los mismos puede incluir una pluralidad de especies cuyo terminal C exhibe heterogeneidad. Por ejemplo, las composiciones de esPH20 expresado recombinantemente producido por expresión del polipéptido de la SEQ ID NO: 8, que codifica un esPH20 que tiene aminoácidos 36-497, pueden incluir formas con menos aminoácidos, tal como 36-496, 36-495.

Como se usa en la presente, una porción ligada a N se refiere a un residuo de aminoácido de asparagina (N) de un polipéptido que es capaz de que se glicosila por modificación post-traduccional de un polipéptido. Las porciones ligadas a N ejemplares de PH20 humano incluyen aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368 y N393 de PH20 humano establecidos en la SEQ ID NO: 107.

Como se usa en la presente, un polipéptido N glicosilado se refiere a un polipéptido PH20 o forma truncada de los mismos que contienen unión de oligosacárido de al menos tres residuos de aminoácidos ligados a N, por ejemplo, porciones ligadas a N que corresponden a residuos de aminoácidos N235, N368 y N393 de la SEQ ID NO: 107. Un polipéptido N glicosilado puede incluir un polipéptido donde tres, cuatro, cinco y hasta todas de las porciones ligadas a N se ligan a un oligosacárido. Los oligosacáridos ligados a N pueden incluir oligomanosa, oligosacáridos complejos, híbridos o sulfatados, u otros oligosacáridos y monosacáridos.

Como se usa en la presente, un polipéptido N parcialmente glicosilado se refiere a un polipéptido que mínimamente contiene un glicano de N-acetilglucosamina ligado a al menos tres porciones ligadas a N. Un polipéptido parcialmente glicosilado puede incluir diversas formas de glicano, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos, y formas de azúcar ramificadas, incluyendo aquellas formadas por tratamiento de un polipéptido con EndoH, EndoF1, EndoF2 y/o EndoF3. El escisión de glicanos por tales enzimas se representa, por ejemplo, en la Figura 2.

Como se usa en la presente, un polipéptido PH20 deglicosilado se

refiere a un polipéptido PH20 proporcionado en la presente en el cual pocos de todos los posibles sitios de glicosilación se glicosilaron. La deglicosilación se puede efectuar, por ejemplo, al remover la glicosilación, por la prevención, o al modificar el polipéptido para eliminar un sitio de glicosilación. Como se muestra en la presente, los sitios de N glicosilación particular no se requieren para actividad, mientras que otros son.

Como se usa en la presente, una enfermedad asociada con hialuronano, trastorno o afección se refiere a cualquier enfermedad o afección en la cual los niveles de hialuronano se elevan como causa, consecuencia o de otra manera se observan en la enfermedad o afección. Las enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano se asocian con elevada expresión de hialuronano en un tejido o célula, presión de fluido intersticial incrementada, volumen vascular disminuido, y/o incremento de contenido de agua en un tejido. Las enfermedades asociadas con hialuronano, trastornos o afecciones se pueden tratar por la administración de una composición que contiene una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, por ejemplo, una hialuronidasa soluble, ya sea solo o en combinación con o en la adición a otro tratamiento y/o agente. Las enfermedades y afecciones ejemplares, incluyen, pero no se limitan a, cánceres ricos en hialuronano, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tal como cánceres en última etapa, cánceres metastáticos, cánceres no diferenciados, cánceres de ovario, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de célula escamosa (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres. También ejemplar de enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano son enfermedades que se asocian con elevada presión de fluido intersticial, tal como enfermedades asociadas con presión de disco, y edema, por ejemplo, edema causado por transplante de órgano, apoplejía, trauma cerebral u otras lesiones. Las

enfermedades asociadas con hialuronano ejemplares y afecciones incluyen enfermedades y afecciones asociadas con elevada presión de fluido intersticial, volumen vascular disminuido, y/o contenido de agua incrementado en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento de la afección asociada con hialuronano, enfermedad o trastorno incluye mejora, reducción, u otros efectos benéficos en uno o más de presión de fluido intersticial incrementada (IFP), volumen vascular disminuido, y contenido de agua incrementado en un tejido.

Como se usa en la presente, un conjugado se refiere a polipéptidos PH20 solubles ligados directamente o indirectamente a uno o más de otros polipéptidos o porciones químicas. Tales conjugados incluyen proteínas de fusión, aquellas producidos por conjugados químicos y aquellos producidos por cualquier otro método por el cual al menos un polipéptido PH20 soluble se liga, directamente o indirectamente a otro polipéptido o porción química siempre y cuando el conjugado conserva la actividad de hialuronidasa. Ejemplar de conjugados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos PH20 ligados directamente o indirectamente a un dominio de multimerización, tal como una porción Fc, una toxina, una etiqueta o un fármaco.

Como se usa en la presente, una proteína de fusión se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia de codificación de una molécula de ácido nucleico y la secuencia de codificación de otra molécula de ácido nucleico en la cual las secuencias de codificación están en el mismo marco de lectura de tal manera que cuando el constructo de fusión se transcribe y traduce en una célula hospedera, la proteína se produce conteniendo las dos proteínas. Las dos moléculas pueden ser adyacentes en el constructo o separadas por un polipéptido ligador que contiene, 1, 2, 3, o más, pero típicamente menos de 10, 9, 8, 7, o 6 aminoácidos. El producto de proteína codificado por un constructo de fusión se

refiere a como un polipéptido de fusión. Ejemplos de polipéptidos de fusión incluyen fusiones Fc.

Como se usa en la presente, un polímero que se conjuga a una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, se refiere a cualquier polímero que se liga covalentemente o de otra manera establemente, directamente o por medio de un ligador, a una enzima que degrada hialuronano. Tales polímeros, típicamente incrementan vida media de suero, e incluye, pero no se limita a porciones siálicas, porciones de pegilación, dextrano, y azúcar y otras porciones, tal como para glicosilación.

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

Como se usa en la presente, la actividad de hialuronidasa se refiere a la capacidad para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico. El ensayo XXII de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para hialuronidasa determina la actividad de hialuronidasa indirectamente al medir la cantidad de ácido hialurónico de mayor peso molecular, o hialuronano, sustrato (HA) que permanece después de que la enzima se permite reaccionar con el HA por 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Una solución Estándar de Referencia se puede usar en un ensayo para determinar la actividad relativa, en unidades, de cualquier hialuronidasa. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad de hialuronidasa de hialuronidasas, tal como PH20, incluyendo PH20 soluble

y esPH20, se conocen en la técnica y se describen en la presente. Los ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbidez descrito abajo (ver por ejemplo Ejemplo 12) que mide el escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente al detectar el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico no escindido se enlaza con albúmina de suero. Los Estándares de Referencia se pueden usar, por ejemplo, para generar una curva estándar para determinar la actividad en unidades de la hialuronidasa que se prueba.

Como se usa en la presente, activo neutro se refiere a la capacidad de un polipéptido PH20 para catalizar enzimáticamente la escisión de ácido hialurónico en pH neutro. Un activo neutro truncado en C terminal o PH20 parcialmente N glicosilado proporcionados en la presente tienen o tienen alrededor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de actividad comparada con la actividad de hialuronidasa de un PH20 activo neutro correspondiente que no es truncado C terminalmente o parcialmente N glicosilado.

Como se usa en la presente, una secuencia de señal de enlace de ancla GPI es una secuencia de terminal C de aminoácidos que dirigen la adición de un ancla GPI realizada al polipéptido dentro del lumen del ER. Las secuencias de señal de enlace de ancla GPI se presentan en los polipéptidos precursores de Polipéptidos GPI anclados, tal como Polipéptidos PH20 GPI anclados. La secuencia de señal de enlace de ancla GPI de terminal C típicamente contiene una región hidrofóbica predominante de 8-20 aminoácidos, precedida por una región de espaciador hidrofílica de 8-12 aminoácidos, inmediatamente cadena abajo del sitio ω, o sitio de enlace de ancla GPI. Las secuencias de señal de enlace de ancla GPI se pueden identificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, métodos *in silico* y algoritmos (ver, por ejemplo Udenfriend et al. (1995) *Methods*

Enzymol. 250:571-582, Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758, Kronegg and Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", por ejemplo, the website 129.194.185.165/dgpi/, Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni et al., (2008) BMC Bioinformatics 9:392), incluyendo aquellos que están fácilmente disponibles en sitios web bioinformáticos, tal como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (por ejemplo, el sitio WorldWideWeb expasy.ch/tools/).

Como se usa en la presente, un polipéptido bifucosilado se refiere a un polipéptido que tiene dos residuos de fucosa, uno con una ligadura α1,3 y los otros con ligadura α1,6, ligado a la misma porción de núcleo de N-acetilglucosamina, con la porción de N-acetilglucosamina ligado al residuo de asparagina en la cadena de polipéptido. Los polipéptidos bifucosilados generalmente se producen en células de insecto.

Como se usa en la presente, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos de péptido (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser de hebra sencilla y doble. Cuando se refiere a sondas o cebadores, que se etiquetan opcionalmente, tal como con una etiqueta detectable, tal como moléculas de hebra sencilla, fluorescente o radioetiqueta se contemplan. Tales moléculas son típicamente de una longitud de tal manera que su objetivo es estadísticamente única o de número de copia bajo (típicamente menos de 5, generalmente menos de 3) para probar o preparar una colección. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de complementariedad de secuencia a o idénticos a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos largos.

Como se usa en la presente, un péptido se refiere a un polipéptido que es mayor que o igual a 2 aminoácidos en longitud, y

menos de o igual a 40 aminoácidos en longitud. Como se usa en la presente, los aminoácidos que se presentan en las diversas secuencias de aminoácidos se proporcionan en la presente, identificados de acuerdo a sus abreviaturas conocidas, de tres letras o una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que se presentan en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de letra sencilla estándar usadas rutinariamente en la técnica.

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

Como se usa en la presente, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado sobre la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus ligas de péptido. Los residuos de aminoácidos descritos en la presente se presume que son en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, se pueden sustituir por cualquier residuo de aminoácido L siempre que la propiedad funcional deseada se mantiene por el polipéptido. NH2 se refiere al grupo amino libre presente en el término amino de un polipéptido. El COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el término carboxilo de un polipéptido. Al mantener la nomenclatura estándar de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptado 37 C.F.R. □§§ 1.821-1.822, las abreviaturas para 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	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácidos aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteina
X	Xaa	Desconocido u otro

Todas las secuencias de residuo de aminoácido representadas en la presente por las fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de terminal amino a terminal carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define para incluir los aminoácidos enlistados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y modificados y aminoácidos inusuales, tales como aquellos referidos en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en la presente como referencia. Por otra parte, se notará que un guión en el comienzo o final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un enlace de péptido a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo amino-terminal tal como NH_2 o a un grupo de terminal carboxilo tal como COOH.

Como se usa en la presente, los "α-aminoácidos que se presentan naturalmente" son los residuos de aquellos 20 α-aminoácidos encontrados

en la naturaleza que se incorporan en proteína por el reconocimiento específico de la molécula tARN cargada con su codón mARN cognado en humanos. Los aminoácidos que no se presentan naturalmente por lo tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos que se presentan naturalmente e incluyen, pero no se limitan a, los isoestereómeros D de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ejemplares se describen en la presente y se conocen por aquellos de experiencia en la técnica.

Como se usa en la presente, un constructo de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, de hebra sencilla o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Los constructos de ADN existen como un resultado de 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 grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN más grande, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee de la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa en la presente, el término polinucleótido significa un polímero de hebra sencilla o doble de desoxiribonucleótidos o bases de ribonucleótido leídos del extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizadas in vitro, o preparadas de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se da en la presente en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares base (abreviados "pb"). El término nucleótidos se usa por moléculas de hebra sencilla y doble donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas de hebra doble se usa para denotar longitud total y se entenderá para ser equivalente al

término pares base. Se reconocerá por aquellos expertos en la técnica que las dos hebras de un polinucleótido de hebra doble pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de los mismos se pueden escalonar; así todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de hebra doble no se puede emparejar. Tales extremos no apareados, en general, no excederán 20 nucleótidos en longitud.

Como se usa en la presente, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótido de los ácidos nucleicos. La similitud se puede basar en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y los residuos contenidos en la presente. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos se conocen por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, en un método para probar similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácido o nucleótido se alinean de manera que proporcionan un nivel máximo de identidad entre las secuencias. La "identidad" se refiere al grado en el cual las secuencias de aminoácido o nucleótido son invariantes. La alineación de secuencias de aminoácido, y hasta cierto punto secuencias de nucleótido, también pueden tomar en cuenta diferencias conservadoras y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservadoras son aquellas que preservan las propiedades físico químicas de los residuos implicados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (la alineación de una porción de las secuencias que incluyen únicamente las regiones o región más similar).

"Identidad" per se, tiene un significado reconocido en el arte y se puede calcular usando técnicas publicadas. (Ver, 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, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque existe un número de métodos para medir identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los técnicos expertos (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Como se usa en la presente, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o aminoácido) significa alrededor de, 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 se puede especificar si es necesario. Para propósitos en la presente los términos "homología" e "identidad" se usan frecuentemente intercambiablemente, a menos que se indique de otra manera. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean de manera que se obtiene el apareado de orden más alto (ver, 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, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por homología de secuencia, el número de aminoácidos conservados se determina por programas de algoritmos de alineación estándar, y se pueden usar con penalización de espacio por omisión establecido por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogo se hibridizan típicamente en

severidad moderada o en severidad alta todos a lo largo de la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que hibridiza.

Ya sea que cualquiera de dos moléculas tenga secuencias de nucleótido o secuencias de aminoácido que son al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u "homólogas" se puede determinar usando algoritmos del equipo conocidos tal como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros por omisión como en Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic *Acids Research* 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., *J Mol Biol* 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica se puede usar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen, programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa de "Gap" de University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico se pueden determinar, por ejemplo, al comparar la información de secuencia usando un programa de computadora GAP (por ejemplo, Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443, según lo revisado por Smith and Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (esto es, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parameters por omisión para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación cargada de Gribskov et

al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, como se describe por Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una pena de 3.0 por cada espacio y además 0.10 penalización por cada símbolo en cada espacio; y (3) sin penalización para espacios finales.

Por lo tanto, como se usa en la presente, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido de referencia o polinucleótido. Como se usa en la presente, el término al menos "90% idéntico a" se refiere a porcentaje de identidades desde 90 hasta 99.99 relativo al ácido nucleico de referencia o secuencia de aminoácido del polipéptido. La identidad en el nivel de 90% o más es indicativo del hecho de que, suponiendo para los propósitos de ejemplificación una longitud de polipéptido de prueba y referencia de 100 aminoácidos se comparan. No más del 10% (esto es, 10 de cada 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere de aquel del polipéptido de referencia. Las comparaciones similares se pueden hacer entre los polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones de punto aleatoriamente distribuidas sobre la longitud completa de un polipéptido o que se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud diversa hasta el máximo permitido, por ejemplo 10/100 diferencia de aminoácido (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o eliminaciones de ácido nucleico o de aminoácido. En el nivel de homologías o identidades por arriba de alrededor de 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y parámetros de espacio establecidos; tales niveles altos de identidad se pueden evaluar fácilmente, frecuentemente por alineación manual sin la confianza en software.

Como se usa en la presente, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos.

Típicamente, dos o más secuencias que se relacionan por 50% o más de identidad se alinean. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en posiciones correspondientes y pueden incluir alinear secuencias derivadas de ARNs, tal como ESTs y otros cADNs, alineados 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 inicio de síntesis de ADN dirigido de plantilla bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en la presencia de cuatro diferentes trifosfatos de nucleósido y un agente de polimerización, tal como polimerasa de ADN, polimerasa de ARN o transcriptasa inversa) en una solución amortiguadora apropiada y en una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácido nucleico pueden servir como una "sonda" y como un "cebador." Un cebador, sin embargo, tiene un grupo hidroxilo 3' para extensión. Un cebador se puede usar en una variedad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción de cadena de polimerasa (PCR), (RT)-PCR transcriptasa inversa, PCR ARN, LCR, PCR múltiple, PCR de península, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR in situ, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en la presente, "par cebador" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador 5' (cadena arriba) que hibrida con el extremo 5' de una secuencia para amplificarse (por ejemplo por PCR) y un cebador 3' (cadena abajo) que hibridiza con el complemento del extremo 3' de la secuencia para amplificarse.

Como se usa en la presente, "hibridiza específicamente" se refiere a combinación de pares de bases, por apareamiento de base complementaria, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Aquellos de experiencia en la técnica están familiarizados con parámetros in vitro e in vivo que afectan la hibridación específica, tal como longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente

relevantes a hibridación in vitro además incluyen combinación de pares de bases y temperatura de lavado, composición de solución amortiguadora y concentración de sal. Las condiciones de lavado ejemplares para remover moléculas de ácido nucleico no específicamente enlazadas en severidad alta son 0.1 x SSPE, SDS 0.1%, 65°C, y en severidad media son 0.2 x SSPE, SDS 0.1%, 50°C. Las condiciones de severidad equivalentes se conocen en la técnica. La persona experta puede fácilmente ajustar estos parámetros para alcanzar hibridación específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico objetivo apropiada para una aplicación particular. Complementario, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótido, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridizar, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% desajustes entre nucleótidos opuestos. Si es necesario, el porcentaje de complementariedad se especificará. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de tal manera que se hibridizan bajo condiciones de severidad alta.

Como se usa en la presente, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de manera que la propiedad de interés está suficientemente sin cambios de manera que el producto sustancialmente idéntico se puede usar en lugar del producto.

Como se usa en la presente, también se entiende que los términos "sustancialmente idénticos" o "similares" varían con el contexto como se entiende por aquellos expertos en la técnica relevante.

Como se usa en la presente, una variante alélica o referencias de variación alélica cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosomal. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones de gen pueden ser silentes (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácido alterada. El término "variante alélica" también se usa 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 tipo natural y/o forma predominante de un polipéptido de una población o miembro de referencia sencillo de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre dos o más especies típicamente tienen al menos 80%, 90% o mayor identidad de aminoácido con una forma tipo natural y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es entre especies o dentro de especies. Generalmente, las variantes alélicas dentro de especies tienen al menos alrededor de 80%, 85%, 90% o 95% de identidad o mayor que con una forma tipo natural y/o predominante, incluyendo 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad con una forma tipo natural y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente generalmente se refiere a proteínas n de variaciones entre miembros de la misma especie.

Como se usa en la presente, "alelo," que se usa intercambiablemente en la presente con "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen o porciones de los mismos. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, el sujeto se dice que es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos diferentes alelos de un gen, el sujeto se dice que es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un nucleótido sencillo o diversos nucleótidos, y pueden incluir modificaciones tales como sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, las variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y humano. Ejemplos de variantes de especies que se proporcionan en la presente son PH20 de

primate, tal como, pero no se limita a, de humano, chimpancé, macaco y mono cinomolgo. Generalmente, las variantes de especies tienen 70%, 75%. 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o de identidad de secuencia. Los residuos correspondientes entre dos o más variantes de especies se pueden determinar al comparar y alinear secuencias para maximizar el número de nucleótidos o residuos de coincidencia, por ejemplo, de tal manera que la identidad entre las secuencias es igual a o mayor que 95%, igual a o mayor que 96%, igual a o mayor que 97%, igual a o mayor que 98% o igual a mayor que 99%. A la posición de interés entonces se da el número asignado en la molécula de ácido nucleico de referencia. La alineación se puede efectuar manualmente o por el ojo, particularmente, donde la identidad de secuencia es mayor que 80%. Por ejemplo, la alineación en la Figura 1 muestra que el residuo de aminoácido 491 de PH20 humano corresponde al residuo de aminoácido 491 de PH20 de chimpancé y residuo de aminoácido 497 de PH20 humano corresponde a un residuo de aminoácido 498 de PH20 de chimpancé.

Como se usa en la presente, una variante de empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que resulta en más de un tipo de mARN.

Como se usa en la presente, la modificación es en referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye eliminaciones, inserciones, y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos para modificar un polipéptido son de rutina por aquellos de experiencia en la técnica, tal como al usar 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 contemplan el enlace de polimerasa de ARN e inicio de transcripción. Las secuencias de promotor son comúnmente, pero no siempre, encontradas en la región

no codificada 5' de genes.

Como se usa en la presente, polipéptido aislado o purificado o proteína o porción biológicamente activa de los mismos es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido de la cual la proteína se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. Las preparaciones se pueden determinar para ser sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos estándares de análisis, tal como cromatografía de capa delgada (TLC por sus siglas en ingles), electroforesis de gel y cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC por sus siglas en ingles), usados por aquellos de experiencia en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puro tal que la purificación adicional no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir sustancialmente compuestos químicamente puros se conocen por aquellos de experiencia en la técnica. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales instancias, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

Por consiguiente, la referencia a un polipéptido sustancialmente purificado, tal como un PH20 soluble extendido sustancialmente purificado se refiere a preparaciones de proteínas PH20 que están sustancialmente libres de material celular, incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa de componentes celulares de las células de las cuales se aísla o produce recombinantemente. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de enzima que tienen menos que alrededor de 30% (en peso seco) de proteínas sin enzimas (también referidas en la presente como una proteína de contaminación),

generalmente menos de alrededor de 20% de las proteínas sin enzimas o 10% de las proteínas sin enzimas o menos que alrededor de 5% de las proteínas sin enzimas. Cuando la proteína de enzima se produce recombinantemente, también es sustancialmente libre de medio de cultivo, esto es, medio de cultivo representa menos de alrededor de o en 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína de enzima.

Como se usa en la presente, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos incluyen preparaciones de proteínas de enzima en las cuales la proteína se separa de precursores químicos u otros químicos que se involucran en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de enzima que tienen menos de alrededor de 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o químicos sin enzima o componentes.

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

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

Como se usa en la presente, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para ya sea expresión o replicación de los mismos. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o porción de los mismos en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tal como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y uso de tales vehículos son bien conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

Como se usa en la presente, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que se liga operativamente con secuencias reguladoras, tal como regiones de promotor, que son capaces de efectuar la expresión de tañes fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir promotor y secuencias de terminador, y opcionalmente puede incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un aumentador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de plásmido o ADN viral, o puede contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a un ADN recombinante o constructo de ARN, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, sobre la introducción en una célula hospedera apropiada, resulta en la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por aquellos de experiencia en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o células procarióticas y aquellos que siguen siendo episomal o aquellos que integran en el genoma de célula hospedera.

Como se usa en la presente, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales." Los vectores virales son virus fabricados por ingeniería que se ligan operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportadores) los genes exógenos en las células.

Como se usa en la presente, "operativamente" o "ligado operativamente" cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos se configuran de manera que funcionan en concierto para sus propósitos pretendidos, por ejemplo, inicia la transcripción cadena abajo del promotor y cadena arriba de cualquiera de las secuencias transcritas. El promotor es usualmente el dominio al cual la maquinaria transcripcional enlaza a la transcripción inicial y gana a través del segmento de codificación al terminador.

Como se usa en la presente el término "evaluación" tiene por objeto incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de los mismos, presente en la muestra, y también para obtener un índice, relación, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y las especies químicas actualmente detectadas no necesitan por supuesto ser el producto de proteólisis por sí mismo pero puede por ejemplo ser un derivador de los mismos o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína de complemento, tal como por SDS-PAGE y tinción de proteína con azul de Coomasie.

Como se usa en la presente, la actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan sobre la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otras mezclas. La actividad biológica, por lo tanto, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas se pueden observar en sistemas *in vitro* diseñados para probar o usar tales actividades. Por lo tanto, para propósitos en la presente una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la cual un polipéptido se hidroliza.

Como se usa en la presente equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando el equivalente se usa en referencia a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácido con únicamente sustituciones de aminoácido que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando el equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita presentarse en el mismo grado

(por ejemplo, dos péptidos pueden exhibir diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son usualmente sustancialmente las mismas.

Como se usa en la presente, "modular" y "modulación" o "alterar" se refiere a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, tales como transducción de señal. La modulación puede incluir un incremento en la actividad (esto es, sobre regulación o actividad agonista), una disminución en la actividad (esto es, sub-regulación o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio en periodicidad, frecuencia, duración, cinéticos u otro parámetro). La modulación puede ser dependiente del contexto y típicamente la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína tipo natural, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en un tipo de célula designada o afección.

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

Como se usa en la presente, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más de dos o más artículos. La combinación puede ser dos o más artículos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, pueden ser una mezcla de los mismos, tal como una mezcla sencilla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente asociadas oa relacionadas funcionalmente.

Como se usa en la presente, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo que resulta de causa o afección incluyendo, pero no se limita a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas, y caracterizados por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en la presente son aquellos que

implican componentes del ECM.

Como se usa en la presente, "tratar" un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto están parcialmente o totalmente aliviados, o permanecen estáticos después del tratamiento. Por consiguiente el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención de empeoramiento de síntomas o progresión de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y composiciones proporcionadas en la presente.

Como se usa en la presente, un agente farmacológicamente efectivo, incluye cualquier agente terapéutico o agente bioactivo, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo pequeños fármacos de molécula, que incluyen, pero no se limita a, bisfosfonatos, y proteínas terapéuticas, que incluyen, pero no se limitan a, insulina, moléculas IgG, y anticuerpos.

Como se usa en la presente, un agente terapéutico, incluye cualquier agente farmacológicamente efectivo o agente bioactivo, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo pequeños fármacos de molécula, que incluyen, pero no se limitan a, bisfosfonatos, y proteínas terapéuticas, que incluyen, pero no se limitan a, insulina, moléculas IgG, y anticuerpos.

Como se usa en la presente, tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se mejoran o de otra manera alteran benéficamente.

Como se usa en la presente, efecto terapéutico significa un efecto que resulta de tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o aminora los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que

resulta en un efecto terapéutico que sigue la administración a un sujeto.

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

Como se usa en la presente, un paciente se refiere a un sujeto humano que exhibe síntomas de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en la presente, mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular por el tratamiento, tal como por la administración de una composición farmacéutica u otros terapéuticos, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que se pueden atribuir a, o asociar con la administración de la composición o terapéuticos.

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

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

Como se usa en la presente, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos animales y humanos y envasado individualmente como se conoce en la técnica.

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

Como se usa en la presente, un "artículo de fabricación" es un producto que se hace y vende. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término tiene por objeto abarcar un agente terapéutico con un PH20 soluble, tal como esPH20, o un esPH20 solo, contenido en los mismos o

artículos de empaquetado separados.

Como se usa en la presente, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos por lo tanto abarcan composiciones que están en la forma de semi-sólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de tales composiciones.

Como se usa en la presente, un "kit" se refiere a una combinación de composiciones proporcionadas en la presente y otro elemento para un propósito que incluye, pero no se limita a, reconstitución, activación, e instrumentos/dispositivos para liberación, administración, diagnóstico, y evaluación de una actividad biológica o propiedad. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones para el uso.

Como se usa en la presente, un lisado o extracto celular se refiere a una preparación o fracción que se hace de una célula lisada o fragmentada.

Como se usa en la presente, animal incluye cualquier animal, tal como, pero no se limitan a primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tal como cabras, vacas, ciervos, ovejas; cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las enzimas se proporcionan en la presente de cualquier fuente, animal, planta, procarióticas y hongos. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de 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 se trata 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," "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente lo dicte de otra manera. Por lo tanto, 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, rangos y cantidades se pueden expresar como "alrededor" un valor particular o rango. Alrededor de también incluye la cantidad exacta. Por consiguiente "alrededor de 5 bases" significa "alrededor de 5 bases" y también "5 bases."

Como se usa en la presente, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento descrito posteriormente o circunstancia se presenta o no, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia se produce y casos donde no. Por ejemplo, un grupo sustituido opcionalmente significa que el grupo es no sustituido o es sustituido.

Como se usa en la presente, las abreviaturas para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique de otra manera, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la Comisión IUPAC-IUB en Nomenclatura Bioquímica (ver, (1972) *Biochem.* 11:1726).

B. Información general

Las hialuronidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ácido hialurónico, de tal modo reduciendo la viscosidad de ácido hialurónico e incrementando la permeabilidad de tejido. El PH20 es una hialuronidasa activa neutra y activa con ácido que exhibe la actividad óptima cuando se glicosila. El PH20 humano es una proteína de ancla GPI que se ancla al prospecto extracelular de la membrana de plasma por medio de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) enlazado al C terminal de la proteína. La adición del anclaje GPI a todas las proteínas ancladas GPI ocurre después de la escisión en una posición de aminoácido específico, llamado el sitio ω (típicamente ubicado aproximadamente 20-30 aminoácidos del C terminal), y remoción de la porción de terminal C en el ER. Esta porción de terminal C es la

secuencia de señal de enlace de ancla GPI. La secuencia de señal de enlace de ancla GPI de PH20 humano se ubica en las posiciones de aminoácido 491-509 del polipéptido precursor establecidas en la SEQ ID NO: 107, y el sitio ω es posición 490 de aminoácido. Los polipéptidos PH20 anclados GPI tal como PH20 humano se enlazan a membrana y, por lo tanto, insolubles. Las formas insolubles de PH20 típicamente no son adecuadas para los propósitos terapéuticos.

Los polipéptidos PH20 que carecen de una ancla GPI generalmente se secretan por las células sobre la expresión ya que no contienen una secuencia de señal enlazada a GPI que bloquea el polipéptido a la membrana. Se encuentra en la presente que las formas solubles de PH20 también incluyen aquellas que contienen residuos dentro de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. Los polipéptidos PH20 solubles extendidos (esPH20) son proteínas PH20 solubles que están truncadas en el C terminal pero conservan uno o más residuos de aminoácidos localizados en la secuencia de señal de enlace de ancla GPI del correspondiente polipéptido PH20 tipo natural. Tales polipéptidos esPH20 son solubles y se pueden usar como polipéptidos terapéuticos, tal como para tratar enfermedades asociadas con hialuronano o afecciones y/o para servir como un agente de difusión o dispersión para promover, mejorar o incrementar la dispersión y liberación de otros agentes, fármacos y proteínas mejorando así el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente co-administrado, fármaco o proteína.

1. PH20

El PH20, también conocido como proteína de superficie de esperma, molécula 1 de adhesión de esperma, SPAM1 o HYAL3, es una hialuronidasa. Las hialuronidasas están en una familia de enzimas que degradan ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o hialuronato o HA), un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente importante de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis de

ácido hialurónico, la hialuronidasa disminuye la viscosidad de ácido hialurónico, por lo que incrementa la permeabilidad de tejido. Como tal, las hialuronidasas se han usado, por ejemplo, como un agente de difusión o dispersión en conjunto con otros agentes, fármacos y proteínas para aumentar su dispersión y liberación, y para mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente co-administrado, fármaco o proteína.

El PH20, como otras hialuronidasas de mamífero, es un endo-β-N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace β1→4 glicosídico de ácido hialurónico en diversas longitudes de oligosacárido tal como tetrasacáridos y hexasacáridos. El PH20 tiene ambas actividades hidrolíticas y transglicosidasa y pueden degradar ácido hialurónico y sulfatos de condroitina, tal como C4-S y C6-S. El PH20 se implica naturalmente en adhesión de huevo de esperma y ayuda a la penetración por esperma de la capa de células del cúmulo digiriendo ácido hialurónico. El PH20 se ubica en la superficie del esperma, y en el acrosoma derivado de lisosoma, donde se enlaza a la membrana acrosomal interior. El PH20 de membrana de plasma tiene actividad de hialuronidasa únicamente en pH neutro, mientras que PH20 de membrana acrosomal interior tiene actividad en ambos pH neutro y ácido. Además de que es una hialuronidasa, PH20 también parece ser un receptor para señalización de célula inducida por HA, y un receptor para la zona pellucida que rodea el oocito.

Las proteínas PH20 ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos PH20 humanos (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107, polipéptido maduro establecido en la SEQ ID NO: 108), de bovino (SEQ ID NOS: 111 y 119), conejo (SEQ ID NO: 112), ovino (SEQ ID NOS: 113, 118 y 120), Mono cinomolgo (SEQ ID NO: 114), conejillo de indias (SEQ ID NO: 115), rata (SEQ ID NO: 116), ratón (SEQ ID NO: 117), chimpancé (SEQ ID NO: 197) y Mono rhesus (SEQ ID NO: 198). El transcrito de mARN PH20 humano se traslada normalmente para generar una

proteína de precursor de aminoácido 509 (SEQ ID NO: 107) que contiene una secuencia de señal de aminoácido 35 en la terminal N (posiciones de residuo de aminoácido 1-35 de la SEQ ID NO: 107). Por lo tanto, después de transportar al ER y la remoción del péptido de señal, un polipéptido maduro de aminoácido 474 con una secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 108 se produce. Como se discute abajo, un péptido de terminal C se escinde luego en el ER para facilitar el enlace covalente de un ancla GPI al aminoácido de terminal C recientemente formado en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 490 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107.

El PH20 humano es la hialuronidasa activa neutra prototípica que se bloquea generalmente a la membrana de plasma por medio de una ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI). Como se señaló arriba, PH20 también se expresa en la membrana acrosomal interior donde tiene actividad de hialuronidasa en ambos pH neutro y ácido. La evidencia sugiere que la región de Péptido 1 de PH20, que corresponde a aminoácidos 142-172 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107, se requiere para actividad de enzima en el pH neutro. La región del péptido 3, que corresponde a los aminoácidos 277-297 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107, parece que es importante para la actividad de enzima en pH ácido (Cherr et al., (2001) *Matrix Biology* 20:515-525). Por lo tanto, parece que PH20 contiene dos sitios catalíticos. Además a los sitios catalíticos, PH20 también contiene un sitio de enlace de hialuronano. La evidencia experimental sugiere que este sitio se localiza en la región del Péptido 2, que corresponde a las posiciones de aminoácido 205-235 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107. Esta región es altamente conservada entre hialuronidasas y es similar a la porción que enlaza heparina.

a. Glicosilación

La glicosilación, incluyendo glicosilación ligada a N y O, de

algunas enzimas que degradan hialuronano, incluyendo hialuronidasas, puede ser importante para su actividad catalítica y estabilidad. Los oligosacáridos ligados a N caen en varios tipos principales (oligomanosa, complejo, híbrido), todos de los cuales tienen (núcleos $Man)_3$-GlcNAc-GlcNAc-enlazados por medio del nitrógeno de amida de residuos Asn que caen dentro de secuencias -Asn-Xaa-Thr/Ser- (donde Xaa no es Pro). Un sitio de glicosilación adicional en -Asn-Xaa-Cys- se ha reportado para la proteína C de coagulación. En algunos casos, una enzima que degrada hialuronano, tal como una hialuronidasa, puede contener ambas ligaduras N-glicosídico y O-glicosídico. Por ejemplo, PH20 tiene un oligosacárido ligado a O en el aminoácido T475 así como a seis oligosacáridos ligados a N en aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de PH20 humano, ejemplificado en la SEQ ID NO: 107. Los residuos de aminoácidos N82, N166 y N254 se ocupan por glicanos de tipo complejo mientras que los residuos de aminoácidos N368 y N393 se ocupan por alta manosa tipo glicanos (ver, por ejemplo Ejemplo 6 abajo). El residuo de aminoácido N235 se ocupa por aproximadamente 80% de alata manosa tipo glicanos y 20% de complejo tipo glicanos.

Si bien la alteración del tipo de glicano modifica una glicoproteína puede tener influencias dramáticas en una antigenicidad de la proteína, plegamiento estructural, solubilidad, y estabilidad, la mayoría de las enzimas no se cree que requieren glicosilación para actividad de enzima óptima. Para algunas hialuronidasas, la remoción de glicosilación ligada a N puede resultar en inactivación casi completa de la actividad de hialuronidasa. Por lo tanto, para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N se requiere para generar una enzima activa. La presencia de glicanos ligados a N en los polipéptidos PH20 se requiere para generar una enzima activa. Por ejemplo, se encuentra en la presente, que la deglicosilación completa de PH20 humano, por el tratamiento con el PNGaseF endoglicosidasa o la tunicamicina del inhibidor de fosfotransferasa GlcNAc (GPT), resulta en

50

la pérdida total de la actividad de hialuronidasa (ver, por ejemplo Ejemplos 7-8, abajo). En contraste, la deglicosilación parcial de PH20 humano, por el tratamiento con endoglicosidasa EndoF1, EndoF2, EndoF3 o EndoH, no afecta la actividad de hialuronidasa de PH20 humano (ver, por ejemplo, Ejemplo 7, abajo).

b. Anclaje de GPI

El PH20 humano es una proteína anclada GPI. Como tal, el polipéptido PH20 se ancla al prospecto extracelular de la membrana de plasma por medio de un ancla de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) enlazada al C terminal de la proteína. Las proteínas ancladas GPI tal como PH20 humano se traducen con un péptido de señal de terminal N escindido que dirige la proteína al retículo endoplásmico (ER). En el C terminal de estas proteínas es otra secuencia de señal que dirige la adición de una ancla GPI realizada al polipéptido dentro del lumen de la ER. La adición de la ancla GPI ocurre después del escisión de de la porción de terminal C en una posición de aminoácido específico, llamada el sitio ω (típicamente ubicado aproximadamente 20-30 aminoácidos de el C terminal). Aunque parece no haber ninguna secuencia de consenso para identificar la ubicación del sitio ω, Proteínas ancladas GPI contienen una secuencia de señal de enlace de ancla GPI de terminal C o dominio que típicamente contiene una región hidrofóbica predominante de 8-20 aminoácidos, precedida por una región de espaciador hidrofílica de 8-12 aminoácidos inmediatamente cadena abajo del sitio ω. Esta región de espaciador hidrofílica frecuentemente se enriquece en aminoácidos cargados y prolina (White et al., (2000) *J. Cell Sci.* 113(Pt.4):721-727). Los análisis más detallados sugieren que hay una región de aproximadamente 11 aminoácidos antes de la posición ω-1 que se caracteriza por una baja cantidad de estructura secundaria predicha, una región alrededor del sitio de escisión (sitio ω), de ω-1 a ω+2 que se caracteriza por la presencia de residuos de cadena lateral pequeña, la región de espaciador entre posiciones ω+3 y ω+9, y una cola

hidrofóbica de ω+10 al extremo de terminal C (Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392).

Aunque no hay secuencia de consenso de señal de enlace de ancla GPI, diversos métodos *in silico* y algoritmos se han desarrollado que se pueden usar para identificar tales secuencias en polipéptidos (ver, por ejemplo Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758; Kronegg and Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)," 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), incluyendo aquellos que están fácilmente disponibles en sitios web bioinformáticos, tal como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). Por lo tanto, un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido PH20 probablemente contiene una secuencia de señal de enlace de ancla GPI, y, por lo tanto, si el polipéptido PH20 es una proteína anclada GPI.

La secuencia de señal de enlace de ancla GPI de PH20 humano se ubica en las posiciones de aminoácido 491-509 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 107, y el sitio ω es posición 490 de aminoácido. Por lo tanto, en este modelo de PH20 humano, los aminoácidos 491-509 se escinden después de transportar al ER y un ancla GPI se enlaza covalentemente al residuo de serina en la posición 490. El enlace covalente de una ancla GPI al C terminal de PH20 humano y, por lo tanto, la naturaleza enlazada a la membrana de PH20, se ha confirmado usando estudios de hidrólisis de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (ver, por ejemplo, Lin et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 125:1157-1163 y el Ejemplo 3, abajo). La fosfolipasa C específica de Fosfatidilinositol (PI-PLC) y D (PI-PLD) hidroliza el ancla GPI, que libera el polipéptido PH20 de la membrana celular. El polipéptido PH20 liberado resultante es, por lo tanto, soluble. El PH20

soluble se puede detectar y discriminar de PH20 de enlace de membrana, insoluble usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero no se limita a, aquellos usando un ensayo Triton® X-114, como se describe abajo y en el Ejemplo 4. En este ensayo, la división de hialuronidasas PH20 solubles en la fase acuosa de una solución Triton® X-114 se entibia a 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7) mientras que la división de hialuronidasas PH20 anclada de membrana en la fase enriquecida de detergente. Por lo tanto, además de usar algoritmos para evaluar si un polipéptido PH20 se ancla GPI naturalmente, los experimentos de solubilidad también se pueden realizar.

C. Polipéptidos PH20 Solubles Extendidos

Se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 solubles extendidos (esPH20) y composiciones. Ejemplos de los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente son polipéptidos esPH20 de primate, incluyendo, pero no se limita a, polipéptidos esPH20 de humano y de chimpancé. Los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente son solubles, esto es, secretados, proteínas PH20 que están truncadas en el C terminal pero conservan al menos uno o más residuos de aminoácidos localizados en la secuencia de señal de enlace de ancla GPI del correspondiente polipéptido PH20 tipo natural (por ejemplo están truncados en las posiciones de aminoácido 491-500). Los polipéptidos esPH20 se pueden producir de cualquier polipéptido PH20 anclado de GPI por la modificación del polipéptido PH20 anclado de GPI, que es por la remoción de una porción de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI, siempre que el polipéptido esPH20 resultante es soluble. La solubilidad, o secreción en el medio de cultivo celular, se puede determinar por SDS-PAGE y análisis western blot sobre la expresión, o alternativamente, en un ensayo Triton® X-114, como se describe abajo y en el Ejemplo 4, cuando el polipéptido PH20 se produce por cualquier

método conocido por un experto en la técnica, incluyendo expresión recombinante y síntesis de polipéptido. Los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente se pueden usar, por ejemplo, como polipéptidos terapéuticos, tal como un agente de difusión o dispersión en conjunto con otros agentes, fármacos y proteínas para aumentar su dispersión y suministro, y para mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico del agente co-administrado, fármaco o proteína.

Los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI, proporcionando el polipéptido esPH20 es soluble, esto es, divisiones en la fase acuosa de una solución Triton® X-114, como se describe abajo. Los polipéptidos PH20 solubles extendidos proporcionados en la presente se pueden producir haciendo truncamientos en el C terminal a cualquier polipéptido PH20 anclado de GPI naturalmente, en donde el polipéptido esPH20 resultante es soluble y contiene 1 o más residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. Un experto en la técnica puede determinar si un polipéptido PH20 se ancla GPI usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, usar algoritmos conocidos para predecir la presencia y ubicación de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI y sitio ω, y realizar los análisis de solubilidad antes y después de la digestión con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o D (PI-PLD).

Los polipéptidos esPH20 ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos esPH20 de primates, tal como, por ejemplo, polipéptidos esPH20 de humano y chimpancé. Por ejemplo, los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente se pueden hacer por truncamiento de terminal C de cualquiera de los polipéptidos maduros o precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 107, 108, o 197, o alélico u otras variaciones de los mismos, incluyendo fragmentos activos de los mismos, en donde el polipéptido resultante es soluble y conserva 1 o más

residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. Las variantes alélicas y otras variantes se conocen por uno de experiencia en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOS: 107, 108 y 197. Los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente pueden ser truncados en el C terminal por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos comparados con el polipéptido tipo natural, tal como un polipéptido con una secuencia establecida en las SEQ ID NOS: 107, 108 y 197, siempre que el polipéptido esPH20 resultante es soluble y conserva 1 o más residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI.

Los polipéptidos PH20 solubles extendidos proporcionados en la presente mantienen actividad de hialuronidasa. Adicionalmente, los polipéptidos esPH20 son activos neutros, esto es, retienen la actividad de hialuronidasa en pH neutro. La actividad de hialuronidasa se puede incrementar o disminuir comparado con la forma anclada GPI de tipo natural del PH20. Por ejemplo, los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente pueden exhibir actividad de hialuronidasa que es 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por la forma anclada GPI de tipo natural.

1. Polipéptidos esPH20 Humanos

Ejemplos de los polipéptidos esPH20 proporcionados en la presente son polipéptidos esPH20 humanos. Los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente son solubles y contienen 1 o más residuos de aminoácidos de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. Por lo tanto, se proporcionan en la presente formas solubles de PH20 humano que GPI no carece completamente de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI.

Los polipéptidos esPH20 humanos de precursor proporcionados en la

presente incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen truncamientos en el C terminal para generar polipéptidos que contienen aminoácido 1 hasta aminoácido 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 107. Cuando se expresa en células de mamífero, la secuencia de señal de terminal N de aminoácido 35 se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por lo tanto, los polipéptidos esPH20 humanos maduros contienen aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la SEQ ID NO: 107. Por consiguiente, los polipéptidos esPH20 humanos maduros proporcionados en la presente incluyen aquellos establecidos en las SEQ ID NOS: 59-63 y 100-104, o alélicos u otras variantes de los mismos.

Los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente se pueden expresar en células CHO, o alternativamente producen en cualquier célula o por cualquier método conocido por uno de experiencia en la técnica, siempre que sean solubles y contengan al menos un aminoácido de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. Los polipéptidos esPH20 humanos solubles producidos en células CHO son aquellos que se secretan en el medio de cultivo celular. Se entiende por alguien de experiencia en la técnica que un esPH20 humano se puede secretar parcialmente, que es, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del polipéptido expresado se secreta en el medio de cultivo, siempre que el esPH20 secretado es soluble, esto es, divisiones en la fase acuosa de una solución Triton® X-114, como se describe abajo. Los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente que contienen aminoácidos 1-500, o 36-500, se secretan parcialmente. Adicionalmente, cuando se expresa en células CHO, los polipéptidos esPH20 humanos precursores que contienen aminoácidos 1 hasta 498, 499 o 500, o los polipéptidos esPH20 humanos maduros que contienen aminoácidos 36 hasta 498, 499 o 500, se expresan débilmente (ver, por ejemplo, Ejemplo 3 abajo).

56

Por lo tanto, los polipéptidos esPH20 humanos precursores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tiene truncamientos en el C terminal para generar polipéptidos que contienen aminoácido 1 hasta aminoácido 491, 492, 493, 494, 495, 496 o 497 de la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 107. Cuando se expresa en células de mamífero, después de la escisión del péptido de señal de terminal N durante el procesamiento, los polipéptidos esPH20 humanos maduros contienen los aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496 o 497 de la SEQ ID NO: 107. Por consiguiente, polipéptidos esPH20 humanos maduros ejemplares proporcionados en la presente incluyen aquellos que tienen 456, 457, 458, 459, 460, 461 o 462 aminoácidos en longitud, tal como establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104, o alélicos u otras variantes de los mismos. Las variantes alélicas y otras variantes se conocen por uno de experiencia en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOS: 107 o 108.

También se proporcionan en la presente polipéptidos esPH20 humanos sustituidos con aminoácido, polipéptidos esPH20 sustituidos con aminoácido son polipéptidos esPH20 humanos que se modifican tal que contienen sustituciones de aminoácido, como se compara con los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente, por ejemplo, como los establecidos en las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104. Por lo tanto, polipéptidos esPH20 humanos sustituidos con aminoácido son aquellos que tienen truncamientos en el C terminal. En algunos ejemplos, los polipéptidos esPH20 humanos sustituidos con aminoácido proporcionados en la presente tienen al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida como aminoácidos 1 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496 o 497, o aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496 o 497, de la secuencia de

aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 107. En otros ejemplos, los polipéptidos esPH20 humanos sustituidos con aminoácido tienen 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida como en las SEQ ID NOS: 60-63 y 102-104.

Los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente pueden exhibir actividad de hialuronidasa que se incrementa o disminuye comparado con la forma anclada GPI de tipo natural de PH20. Por ejemplo, los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente pueden exhibir actividad de hialuronidasa que es 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por la formar anclada GPI tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos esPH20 humanos exhiben actividad de hialuronidasa incrementada comparado con la forma anclada GPI tipo natural. La actividad de hialuronidasa de polipéptidos esPH20 humanos se puede incrementar por 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más comparado con la actividad de hialuronidasa de la forma anclada GPI tipo natural.

Los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente exhiben actividad de hialuronidasa neutra activa, o actividad de hialuronidasa cuando se mide en pH neutro, que se incrementa o disminuye comparado con la forma anclada GPI de tipo natural de PH20. Por ejemplo, los polipéptidos esPH20 humanos proporcionados en la presente pueden exhibir actividad de hialuronidasa que es 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por la forma anclada GPI tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos esPH20 humanos exhiben actividad de hialuronidasa neutral activa disminuida comparada con la forma anclada GPI tipo

natural. La actividad de hialuronidasa neutral activa se puede disminuir por 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más comparado con la actividad de hialuronidasa neutral activa de la forma anclada GPI tipo natural. En otros ejemplos, los polipéptidos esPH20 humanos exhiben actividad de hialuronidasa neutral activa incrementada comparado con la forma anclada GPI tipo natural. La actividad de hialuronidasa neutral activa se puede incrementar por 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más comparado con la actividad de hialuronidasa neutral activa de la forma anclada GPI tipo natural.

Típicamente, los polipéptidos esPH20 humanos se producen usando sistemas de expresión de proteínas que facilitan glicosilación N correcta para garantizar al polipéptido conservar la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y estabilidad de aquellos polipéptidos. Las células ejemplares útiles para la expresión recombinante de los polipéptidos esPH20 incluyen, por ejemplo células de Hamster de Ovario Chino (CHO por sus siglas en ingles) (*por ejemplo* células DG44 CHO o CHO-S).

2. Otras especies de polipéptidos esPH20

Se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 solubles extendidos no humanos. Alguien de experiencia en la técnica puede alinear la secuencia de aminoácido de PH20 humano con cualquier polipéptido PH20 no humano para identificar posiciones que corresponden a posiciones 491-500 del polipéptido PH20 humano establecido en la SEQ ID NO: 107, y en el cual las truncamientos en el C terminal se pueden hacer para producir polipéptidos PH20 solubles extendidos. Adicionalmente, algoritmos, tales como aquellos descritos en otra parte de la presente, se pueden usar para predecir la ubicación de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. La solubilidad de los

polipéptidos truncados de terminal C se puede evaluar usando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo los ensayos Triton® X-114 descritos abajo y en el Ejemplo 4, para determinar si los polipéptidos truncados de terminal C producidos son solubles y, por lo tanto, polipéptidos esPH20.

Se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 solubles extendidos de especies de primate no humano. Los polipéptidos PH20 anclados GPI de primate no humano ejemplares incluyen, pero no se limitan a, PH20 de chimpancé (SEQ ID NO: 197). Por lo tanto, se proporcionan en la presente polipéptidos esPH20 de chimpancé. Los polipéptidos esPH20 de chimpancé proporcionados en la presente contienen truncamientos en el C terminal que corresponde a las truncamientos en el C terminal descritas arriba para los polipéptidos esPH20 humanos. Por lo tanto, los polipéptidos esPH20 de chimpancé proporcionados en la presente contienen aminoácidos que corresponden a residuos de aminoácidos 1 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o 501 de la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 107.

Los polipéptidos PH20 de chimpancé se pueden alinear al polipéptido PH20 humano por cualquier método conocido por aquellos de experiencia en la técnica. Tales métodos típicamente maximiza las coincidencias, e incluyen métodos tal como uso de alineaciones manuales y al usar los numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por aquellos de experiencia en la técnica. La Figura 1 proporciona una alineación de los polipéptidos precursores de PH20 de humano y chimpancé. Los residuos de aminoácidos 491 hasta 500 del PH20 humano (en el cual los polipéptidos esPH20 humanos se proporcionan en la presente truncados comparados con el polipéptido PH20 humano tipo natural) corresponden a los residuos de aminoácidos 491 hasta 501 de PH20 de chimpancé. Por lo tanto, se proporcionan en la presente polipéptidos esPH20 de chimpancé que

contienen residuos de aminoácidos 1 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o 501 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 197. Cuando se expresa en un sistema de expresión de mamífero, el péptido de señal de aminoácido 35 se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por lo tanto, los polipéptidos esPH20 de chimpancé maduros contienen aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o 501 de la SEQ ID NO:197.

Los polipéptidos esPH20 de chimpancé ejemplares son aquellos que contienen residuos de aminoácidos 1 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 o 498 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 197. Cuando se expresa en un sistema de expresión de mamífero, el péptido de señal de aminoácido 35 se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por lo tanto, los polipéptidos esPH20 maduros de chimpancé contienen aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, o 498 de la SEQ ID NO: 197.

D. Polipéptidos PH20 Parcialmente N Glicosilados

Se proporcionan en la presente hialuronidasas parcialmente N glicosiladas, incluyendo polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados, que mantienen toda o una porción de la actividad de hialuronidasa de una hialuronidasa N glicosilada. Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas ejemplares incluyen polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados de cualquier especie, tal como cualquiera establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. Las variantes alélicas y otras variantes se conocen por uno de experiencia en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia hasta cualquiera de las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198, o formas truncadas de los mismos. Las hialuronidasas parcialmente

desglicosiladas proporcionadas en la presente también incluyen hialuronidasas parcialmente desglicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasa parcialmente desglicosilada.

Las hialuronidasas parcialmente N glicosiladas proporcionadas en la presente se pueden producir por la digestión con una o más glicosidasas. Por lo tanto, aunque todos los sitios de glicosilación ligados a N (tal como, por ejemplo, aquellos en aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de PH20 humano, ejemplificados en la SEQ ID NO: 107) se pueden glicosilar, el grado de glicosilación se reduce comparado con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. Los polipéptidos de hialuronidasa parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente, incluyendo polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados solubles, pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de un hialuronidasa completamente glicosilada. En un ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de glicosilación N que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 son parcialmente desglicosilados, de tal manera que ya no contienen alta manosa o glicanos tipo complejo, pero que contienen al menos una porción de N-acetilglucosamina. En algunos ejemplos, 1, 2 o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166 de la SEQ ID NO: 107 se desglicosilan, que es, que no contienen una porción de azúcar. En otros ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilaron. Los residuos de aminoácidos glicosilados mínimamente contienen una porción de N-acetilglucosamina.

También se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente N glicosilados. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente carecen de uno o más aminoácidos del C terminal de un polipéptido PH20 de longitud completa, tal como

cualquiera de aquellos establecidos en las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198. Por lo tanto, los polipéptidos PH20 parcialmente N glicosilados truncados de terminal C proporcionados en la presente pueden ser truncados en terminal C por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos comparados con el polipéptido de longitud completa tipo natural, tal como un polipéptido de tipo natural de longitud completa con una secuencia establecida en las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198. En algunos ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilaron. Los residuos de aminoácidos glicosilados mínimamente contienen una porción de N-acetilglucosamina. En otros ejemplos, 1, 2 o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 no se glicosilaron. En ejemplos adicionales, el grado de glicosilación se puede reducir, tal que, los polipéptidos PH20 parcialmente glicosilados truncados de terminal C no contienen alta manosa y glicanos tipo complejo, sino que contienen al menos una porción de N-acetilglucosamina, siempre y cuando retengan actividad de hialuronidasa. Así los polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados truncados de terminal C proporcionados en la presente pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de un polipéptido PH20 truncado de terminal C completamente glicosilado.

Los polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente mantienen la actividad de hialuronidasa. Adicionalmente, los polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos PH20 truncados de terminal C son activos neutros, que es, retienen la actividad de hialuronidasa en pH neutro. La actividad de hialuronidasa se puede incrementar o disminuir comparado con los polipéptidos PH20 de longitud completa

glicosilados y truncados de terminal C. Por ejemplo, lo9s polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente pueden exhibir actividad de hialuronidasa que es 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por los polipéptidos PH20 de longitud completa glicosilados y truncados de terminal C.

Por lo tanto, los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente se pueden usar como polipéptidos terapéuticos, tal como para tratar enfermedades o afecciones asociadas con hialuronano. Los polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados y polipéptidos PH20 truncados de terminal C también se pueden usar, por ejemplo, en terapia de combinación.

1. Polipéptidos PH20

Las hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas ejemplares proporcionadas en la presente incluyen polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados de cualquier especie, tal como cualquiera establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS:107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas. Las variantes alélicas y otras variantes se conocen por los expertos en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: NOS:107-109, 111-120, 197 y 198, o formas truncadas de las mismas. En algunos ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilan. En otros ejemplos, 1, 2, o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166 y N254 de la SEQ ID NO: 107 no se glicosilan. En algunos ejemplos, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 contienen de forma mínima una porción de N-acetilglucosamina.

Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en la presente pueden producirse por digestión con una o más glicosidasas. De esta manera, aunque todos los sitios de glicosilación ligados a N (tal como, por ejemplo, aquellos en aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de PH20 humano, ejemplificados en SEQ ID NO:107) puede glicosilarse, la extensión de la glicosilación se reduce comparado con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. En particular, las hialuronidasas parcialmente glicosiladas mantienen al menos una porción de N-acetilglucosamina en cada uno de los sitios de glicosilación ligados a N. Las hialuronidasas parcialmente glicosiladas pueden glicosilarse en 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, las hialuronidasas se desglicosilan en 1, 2, o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a residuos de aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107. Los polipéptidos PH20 parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

Las glicosidasas, o glicósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de la ligadura glicosídica para generar dos azúcares más pequeños. Como se muestra en la Figura 2, los tipos principales de N-glicanos en vertebrados incluyen manosa glicanos superiores, glicanos híbridos y glicanos en complejo. Hay varias glicosidasas que resultan sólo en desglicosilación de proteína parcial, incluyendo: EndoF1, que escinden glicanos tipo manosa e híbridos superiores; EndoF2, que escinden glicanos tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinden glicanos en complejo biantenarios y más ramificados; y EndoH, que escinden glicanos tipo manosa e híbridos superiores (Figura 3). El tratamiento de una hialuronidasa, tal como una hialuronidasa soluble, tal como un PH20 soluble, con uno o todos

estas glicosidasas puede resultar sólo en desglicosilación parcial y, por lo tanto, retención de actividad de hialuronidasa.

Por ejemplo, el tratamiento de rHuPH20 con una o todas estas glicosidasas resulta en desglicosilación parcial. Estos polipéptidos rHuPH20 parcialmente desglicosilados exhiben actividad enzimática de hialuronidasa que es comparable a los polipéptidos completamente glicosilados (ver por ejemplo, Ejemplo 7). En contraste, el tratamiento de rHuPH20 (SEQ ID NO:122) con PNGaseF, una glicosidasa que escinde todos los N-glicanos (ver Figura 3), o tratamiento con la tunicamicina inhibidor de GlcNAc fosfotransferasa (GPT, por sus siglas en inglés), resulta en la desglicosilación completa de todos los N-glicanos y por ello vuelve el PH20 enzimáticamente inactivo (ver por ejemplo, Ejemplos 7-8, abajo).

Los polipéptidos de hialuronidasa parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente, incluyendo polipéptidos PH20 solubles parcialmente desglicosilados, pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. Típicamente, las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas, incluyendo polipéptidos PH20 solubles parcialmente desglicosilados, proporcionados en la presente exhiben actividad de hialuronidasa que es 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por la hialuronidasa completamente glicosilada.

Las hialuronidasas parcialmente desglicosiladas proporcionadas en la presente también incluyen hialuronidasas parcialmente desglicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasa parcialmente desglicosilados.

2. Polipéptidos PH20 truncados en terminal C

Los ejemplos de péptidos PH20 N-glicosilados parcialmente, o

parcialmente desglicosilados, proporcionados en la presente son polipéptidos PH20 truncados de terminal C. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente glicosilados proporcionados en la presente carecen de uno o más aminoácidos de el C terminal del polipéptido PH20 de longitud completa como se establece en SEQ ID NOS:107-109, 111-120, 197 y 198. De esta manera, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente glicosilados proporcionados en la presente pueden truncarse en el C terminal por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más aminoácidos comparados con el polipéptido de tipo natural de longitud completa, tal como un polipéptido de tipo natural de longitud completa con una secuencia establecida en SEQ ID NOS:107-109, 111-120, 197 y 198. En algunos ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107, se glicosilan. En otros ejemplos, 1, 2, o 3 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a aminoácidos N82, N166 and N254 de la SEQ ID NO: 107, no se glicosilan.

Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente pueden producirse por digestión con una o más glicosidasas. Aunque todos los sitios de glicosilación ligados a N (tal como, por ejemplo, aquellos en los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de PH20 humano, ejemplificados en SEQ ID NO:107) puede glicosilarse, la extensión de la glicosilación se reduce comparado con una hialuronidasa que no se digiere con una o más glicosidasas. De esta manera, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. En particular, las hialuronidasas parcialmente N-glicosiladas mantienen al menos una porción de N-acetilglucosamina en cada uno de los sitios de glicosilación ligados a

N. En algunos ejemplos, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 contienen de forma mínima una porción de N-acetilglucosamina. En otros ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilan al nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada en cada uno de los 3, 4, 5, o 6 sitios de N-glicosilación. En ejemplos adicionales, 1, 2, o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se desglicosilan completamente. En estos ejemplos, típicamente, los aminoácidos N82, N166 o N254 se desglicosilan completamente.

Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente N-glicosilados ejemplares son de cualquier especie, tal como cualquiera establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas. Las variantes alélicas y otras variantes se conocen por los expertos en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: NOS:107-120, 197 y 198, o formas truncadas de las mismas. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente N-glicosilados proporcionados en la presente también incluyen polipéptidos PH20 híbridos, de fusión y quiméricos, y conjugados PH20. Por ejemplo, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente pueden conjugarse a un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o porción sialilo, u otros de tales polímeros, tal como polímeros naturales o de azúcar. En otros ejemplos, el polipéptido PH20 truncado en terminal C parcialmente N-glicosilado se liga o fusiona a un dominio tal como un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG.

Se incluye entre los polipéptidos truncados en el C terminal glicosilados o parcialmente glicosilados proporcionados en la presente aquellos que están truncados en el C terminal por 2 aminoácidos hasta 44 aminoácidos comparados con el PH20 de tipo natural establecido en SEQ ID NO:107 (polipéptido precursor) o 108 (polipéptido maduro), o variantes alélicas o de especies de los mismos. De esta manera, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C incluyen cualquiera que tienen truncamientos en el C terminal para generar polipéptidos que contienen el aminoácido 1 hasta el aminoácido 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 o 507 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 107, o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de las mismas, con 2, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107, glicosilados. Cuando se expresan en células de mamífero, la secuencia de señal de terminal N de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. De esta manera, se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 truncados de terminal C maduros que contienen los aminoácidos 36 hasta 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 o 507 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 107 o posiciones correspondientes en una variante alélica o de especie de las mismas, con 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a los aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107, glicosilados.

La Tabla 2 proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos PH20 truncados de terminal C ejemplares que pueden glicosilarse o desglicosilarse parcialmente. En la Tabla 2 enseguida, se proporcionan la longitud (en aminoácidos) de los polipéptidos precursor y maduro, y el identificador de secuencia (SEQ ID NO) en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares de los polipéptidos precursor y maduro de las proteínas PH20 truncadas de terminal C se establecen. El polipéptido PH20 de tipo natural también se incluye en la Tabla 2 para comparación.

Tabla 2. Polipéptidos PH20 truncados de terminal C ejemplares

Polipéptido	Precursor (aminoácidos)	SEQ ID NO Precursor	Maduro (aminoácidos)	SEQ ID NO Maduro
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-ISSV	506	45	471	97
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-LIIS	504	46	469	98
SPAM1-FLII	503	5	468	57
SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-MFIV	496	50	461	102
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-ATMF	494	51	459	103
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-LSAT	492	52	457	104
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-SPST	488	53	453	105
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-NASP	486	54	451	106
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69

SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71
SPAM1-EPQI	480	20	445	72
SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76
SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83
SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-GDVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

Los polipéptidos PH20 truncados en terminal C N-glicosilados y parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente incluyen aquellos que son solubles, es decir división en la fase acuosa de una solución Triton® X-114, y aquellos que son insolubles, es decir división en la fase detergente de una solución Triton® X-114. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados proporcionados en la presente pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. Alternativamente, los polipéptidos PH20 truncados en terminal C parcialmente desglicosilados pueden tener 1, 2

o 3 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a aminoácidos N82, N166 y N254 de la SEQ ID NO: 107, que no se glicosilan. De forma mínima, un sitio de N-glicosilación, a glicosilarse, contiene al menos una porción de N-acetilglucosamina.

En algunos ejemplos, los polipéptidos truncados de terminal C parcialmente N-glicosilados proporcionados en la presente son solubles, es decir, no están anclados a GPI. Esto puede evaluarse, por ejemplo, usando un ensayo Triton® X-114 después de la incubación con PI-PLC o PI-PLD, como se describe enseguida y en el Ejemplo 4. Por ejemplo, los polipéptidos PH20 que son truncados en el C terminal en o 5' para la posición de aminoácido que corresponde a la posición 490 del residuo de aminoácido del polipéptido PH20 establecido en SEQ ID NO:107 típicamente son solubles cuando se expresan en un sistema de expresión de mamífero (ver, por ejemplo el Ejemplo 3). Estos polipéptidos son solubles en virtud del hecho de que carecen completamente de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI. En otros ejemplos, los polipéptidos truncados en terminal C parcialmente glicosilados proporcionados en la presente son enlazados a la membrana e insolubles cuando se expresan en un sistema de expresión de mamífero. Por ejemplo, los polipéptidos PH20 que son truncados en el C terminal en o 3' de la posición de aminoácido que corresponde a la posición del aminoácido 500 del polipéptido PH20 establecido en SEQ ID NO:107 típicamente son insolubles cuando se expresan en un sistema de expresión de mamífero (ver, por ejemplo el Ejemplo 3). Los polipéptidos truncados en el C terminal proporcionados en la presente que pueden glicosilarse parcialmente en tal 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilan.

Los polipéptidos PH20 truncados en el C terminal parcialmente glicosilados solubles proporcionados en la presente incluyen aquellos que están truncados pero mantienen al menos uno o más residuos de

aminoácidos localizados en la señal de enlace de ancla GPI, y aquellos que carecen completamente de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI y el sitio ω. De esta manera, en lugar de tener un ancla GPI enlazada covalentemente al C terminal de la proteína en el ER y anclarse a la valva extracelular de la membrana de plasma, estos polipéptidos se secretan. Estos polipéptidos PH20 solubles truncados en terminal C pueden glicosilarse parcialmente de tal manera que 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación se glicosilan. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C solubles ejemplares que carecen de la secuencia de señal de enlace de ancla GPI son de cualquier especie, tal como cualquiera establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 107-109, 111-120, 197 y 198, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas. Estos polipéptidos PH20 truncados de terminal C solubles parcialmente glicosilados tienen truncamientos en el C terminal para generar polipéptidos que contienen aminoácidos 1 hasta 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos establecido en SEQ ID NO: 107. Durante la escisión de la secuencia de señal de terminal N que sigue a la expresión en células de mamífero, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C solubles parcialmente glicosilados maduros contienen los aminoácidos 36 hasta 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, los polipéptidos PH20 solubles truncados de secuencia de señal de ancla GPI de terminal C son parcialmente glicosilados, contienen, por ejemplo, al menos una N-acetilglucosamina en 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-

glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107. En otros ejemplos, los polipéptidos PH20 solubles truncados de secuencia de señal de ancla GPI de terminal C tienen 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados que mantienen al menos un aminoácido en la secuencia de señal de enlace de ancla GPI proporcionados en la presente son polipéptidos PH20 solubles parcialmente desglicosilados extendidos. En algunos ejemplos, los polipéptidos PH20 truncados en terminal C parcialmente desglicosilados no se glicosilan en 1, 2 o 3 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166 y N254 de la SEQ ID NO: 107. Estos polipéptidos PH20 solubles parcialmente desglicosilados extendidos contienen los aminoácidos 1 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 107. Cuando se expresan en células de mamífero, la secuencia de señal de terminal N de 35 aminoácidos se escinde durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. De esta manera, la forma madura de los polipéptidos esPH20 parcialmente desglicosilados que contienen los aminoácidos 36 hasta 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la secuencia de aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 107. Las formas humanas maduras de polipéptidos esPH20 parcialmente glicosilados proporcionados en la presente incluyen aquellos establecidos en SEQ ID NOS: 59-63 y 100-104 que contienen al menos una N-acetilglucosamina en 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107. En algunos ejemplos, la extensión de la glicosilación se reduce por tratamiento con una endoglicosidasa. De esta manera, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados que contienen al menos un aminoácido en la secuencia de señal de enlace de ancla GPI

proporcionados en la presente pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada.

También se proporcionan en la presente polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados que no son solubles, esto es, se enlazan a la membrana celular y por lo tanto no secretan en el medio durante la expresión. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C que no son solubles pueden ser parcialmente desglicosilados en tanto mantengan actividad de hialuronidasa. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C maduros parcialmente glicosilados ejemplares que no son solubles son aquellos que contienen aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácido 36 hasta 501, 502, 503, 504, 505, 506 o 507 de la SEQ ID NO:107. Por lo tanto, polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente glicosilados proporcionados en la presente que no son solubles incluyen aquellos que tienen 466, 467, 468, 469, 470, 471 o 472 aminoácidos en longitud, tal como aquellos establecidos en SEQ ID NOS: 55-58 y 97-99, que mantienen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80% del nivel de glicosilación de una hialuronidasa completamente glicosilada. En algunos ejemplos, 3, 4, 5, o 6 de los sitios de N-glicosilación que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107 se glicosilan. En otros ejemplos, el 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de N-glicosilación, que corresponden a aminoácidos N82, N166, N235, N254, N368, y N393 de la SEQ ID NO: 107, contienen al menos una porción de N-acetilglucosamina.

Los polipéptidos truncados en terminal C parcialmente glicosilados proporcionados en la presente puede exhibir actividad de hialuronidasa que está incrementada o reducida comparado con la forma anclada a GPI de tipo natural del PH20. Adicionalmente, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C parcialmente desglicosilados son activos neutros, esto es, mantienen actividad de hialuronidasa a pH

neutro. Por ejemplo, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente puede exhibir actividad de hialuronidasa que es 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o más de la actividad de hialuronidasa exhibida por la forma anclada a GPI de tipo natural. En algunos ejemplos, los polipéptidos PH20 truncados en terminal C parcialmente glicosilados exhiben actividad de hialuronidasa incrementada comparada con la forma anclada a GPI de tipo natural.

Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente también pueden ser N-glicosilados. Las hialuronidasas N-glicosiladas y parcialmente N-glicosiladas proporcionadas en la presente también incluyen hialuronidasas N-glicosiladas y parcialmente N-glicosiladas híbridas, de fusión y quiméricas, y conjugados de hialuronidasa N-glicosilados y parcialmente desglicosilados.

3. Modificaciones Adicionales

Los polipéptidos PH20 incluidos en la presente, incluyendo polipéptidos esPH20 humanos, polipéptidos PH20 truncados en el C terminal N-glicosilados y parcialmente N-glicosilados y polipéptidos PH20 parcialmente glicosilados, también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o postraducción y aquellos que no contienen modificaciones químicas o postraducción. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, sialación, albúminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptido conocidas en la técnica. De esta manera, los polipéptidos PH20 truncados de terminal C, incluyendo polipéptidos esPH20, proporcionados en la presente pueden contener otras modificaciones que están o no en la secuencia primaria del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, de una porción de carbohidrato, una porción de polietilenglicol (PEG), una porción de silación, un dominio Fc de inmunoglobulina G, o cualquiera de otro

dominio o porción. Por ejemplo, tales modificaciones adicionales pueden hacerse para incrementar la estabilidad o vida media en suero de la proteína. Los polipéptidos PH20 truncados de terminal C, incluyendo polipéptidos esPH20, proporcionados en la presente pueden conjugarse o fusionarse a cualquier porción usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos químicos y recombinantes, proporcionando el polipéptido resultante que mantiene actividad de hialuronidasa.

Inmunogenicidad reducida

Los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente, incluyendo los polipéptidos esPH20 humanos, pueden hacerse para tener inmunogenicidad reducida. La inmunogenicidad reducida puede efectuarse por cambios de secuencia que eliminan epítopos antigénicos del polipéptido o al alterar modificaciones post-traducción. Por ejemplo, se contempla alterar la glicosilación del péptido, de manera que los polipéptidos contienen de forma mínima al menos N-acetilglucosamina en los residuos de aminoácidos N235, N368 y N393 de la SEQ ID NO:107.

Por ejemplo, los polipéptidos PH20 pueden modificarse de tal manera que carecen de fucosa, particularmente bifucosilación. En particular, los polipéptidos PH20 se proporcionan en la presente no bifucosilados. Esto puede alcanzarse al expresar y producir el polipéptido PH20 en células hospederas, típicamente células hospederas de insecto, que no efectúan bifucosilación. La fucosa es una desoxihexosa que está presente en una amplia variedad de organismos, incluyendo mamíferos, insectos y plantas. Los glicanos fucosilados se sintetizan por fucosil-tranferasas. Ver, por ejemplo, Ma et al., *Glycobiology*, 15(2):158R-184R, (2006); Nakayama et al., *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); y Sturla et al., *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005). En humanos, la fucosa existe frecuentemente como una modificación terminal a las estructuras de glicano, y la presencia de fucosa α1,6-ligada a N-acetilglucosamina se ha demostrado que es

importante en el procesamiento y reconocimiento de glicoproteína. En insectos, las estructuras de núcleo N-glicano exhiben bifucosilación con ligadoras α1,6- y α1,3-. La fucosilación de núcleos de célula de insecto con ligadoras α1,3- genera un epítopo de carbohidrato que es inmunogénico en humanos (ver, por ejemplo, Solicitud de Patente E.U.A. No. 20070067855). Por ejemplo, los polipéptidos PH20 proporcionados en la presente, incluyendo polipéptidos esPH20, pueden generarse en células hospederas que son incapaces de bifucosilar el polipéptido. De esta manera, aunque las células de insecto u otras células que bifucosilan pueden usarse para expresión de los polipéptidos, típicamente se usan células de mamífero, tal como células CHO.

En algunos ejemplos, los polipéptidos PH20 desfucosilados, o deficientes en fucosa pueden generarse en células de insecto con trayectorias de glicosilación modificadas, a través del uso de vectores de expresión de baculovirus que contienen genes de procesamiento de oligosacárido eucariótico, por ello se crean sistemas de expresión en célula de insecto "tipo mamífero" (ver, por ejemplo, Patente E.U.A. No. 6,461,863). Alternativamente, puede eliminarse la antigenicidad por expresión de polipéptidos PH20 en células de insecto que carecen de α1,3-fucosiltransferasa (FT3) (ver, por ejemplo, Solicitud de Patente E.U.A. No. 20070067855). En otros ejemplos, pueden generarse polipéptidos PH20 desfucosilados o deficientes en fucosa, por ejemplo, en líneas de célula que producen proteínas desfucosiladas, incluyendo células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Sol. Pat. E.U.A. No. 2003/0157108; y WO 2004/056312), y líneas de célula agénicas, tal como gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO agénicas (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Conjugación a polímeros

En algunos ejemplos, los polipéptidos esPH20 y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, incluyendo polipéptidos PH20 parcialmente

78

glicosilados, se proporcionan en la presente conjugados a polímeros. Los polímeros ejemplares que pueden conjugarse a los polipéptidos PH20, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir poli-OH), poliaminas (es decir poli-NH_2) y ácidos policarboxílicos (es decir poli-COOH), y heteropolímeros adicionales es decir polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes *por ejemplo* un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas apropiadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tal como polialquilen glicoles (PAG), incluyendo polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres de PEG-glicidilo (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), polietilenglicoles ramificados (PEGs), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, anhídrido de ácido polietilen-co-maleico, anhídrido de ácido poliestiren-co-maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, incluyendo metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolisados de chitosan, almidones tales como hidroxietil-almidones e hidroxipropil-almidones, glicógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma guar, pululan, inulina, goma de xantano, carragenina, pectina, hidrolisados de ácido algínico y bio-polímeros.

Típicamente, los polímeros son óxidos de polialquileno (PAO), tal como óxidos de polietileno, tal como PEG, típicamente mPEG, que, en comparación con los polisacáridos tales como dextrano, pululan y similares, tienen algunos grupos reactivos capaces de reticularse. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tal como (metoxi)polietilenglicol (mPEG) que se conjugan covalentemente a los polipéptidos esPH20 y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C (*por ejemplo*, a grupos enlazados en la superficie de proteína) usando

una química relativamente sencilla.

Las moléculas poliméricas apropiadas para enlace a los polipéptidos esPH20 y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tal como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), éteres de PEG-glicidilo (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEGs ramificados, y óxido de polietileno (PEO) (ver *por ejemplo* Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris and Zalipsky (eds.) "Poly(ethylen glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris and Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; y Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular típicamente en el intervalo desde alrededor de 3 kDa hasta alrededor de 60 kDa. En algunas modalidades la molécula polimérica que está conjugada a un polipéptido PH20 proporcionado en la presente tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Se conocen en la técnica varios métodos para modificar polipéptidos al enlazar covalentemente (conjugar) un PEG o derivado de PEG (es decir "PEGilación") (ver *por ejemplo*, U.S. 2006/0104968; U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; y U.S. 2004/0235734). Las técnicas para PEGilación incluyen, pero no se limitan a, ligadores especializados y químicas de acoplamiento (ver *por ejemplo*, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), enlace de porciones PEG múltiples a un sitio de conjugación sencillo (tal como por medio del suo de PEGs ramificados; ver *por ejemplo*, Veronese et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación de sitio específico y/o mono-PEGilación (ver *por ejemplo*, Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida al sitio (ver *por ejemplo*, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (ver, también, por ejemplo, Lu and Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu and Felix

80

(1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu *et al.* (1995) *J Immunol.* 154:3088-95; ver también, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). los métodos y técnicas descritos en el arte pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados PEG enlazados a una molécula de proteína sencilla (ver *por ejemplo*, U.S. 2006/0104968).

Se han descrito numerosos reactivos para PEGilación en la técnica. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), mPEG succinimidilo, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato de mPEG succinimidilo, propionato de mPEG succinimidilo, butanoato de mPEG succinimidilo, éster succinimidilo del ácido carboximetil 3-hidroxibutanoico mPEG, propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional, propionaldehído PEG homobifuncional, butiraldehído PEG homobifuncional, maleimida PEG, hidrazinda PEG, PEG p-nitrofenil-carbonato, mPEG-benzotriazol carbonato, PEG propionaldehído, mPEG butiraldehído, butiraldehído mPEG2 ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, maleimida mPEG "sin ligadura", mPEG vinil sulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltioéster, mPEG ortopiridil disulfuro, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-NHS (ver *por ejemplo*, Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polimers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795,569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990,237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S.

6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

Otras modificaciones

Los polipéptidos esPH20 y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente también incluyen fusiones y conjugados de los mismos.

E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos que Codifican PH20 Solubles Extendidos y otras Hialuronidasas PH20 Solubles, y Polipéptidos de los Mismos

Los polipéptidos de PH20 solubles extendidos, hialuronidasas PH20 truncadas de terminal C, y hialuronidasas PH20 parcialmente glicosiladas establecidas en la presente, y moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, pueden obtenerse por métodos bien conocidos en la técnica para expresión de proteína recombinante y purificación de proteína. Por ejemplo, el ADN puede obtenerse de ADN clonado (por ejemplo de una colección de ADN), por síntesis química, por clonación de cADN, o por la clonación de ADN genómico o fragmentos de los mismos, purificados de la célula deseada. Cuando se producen los polipéptidos por medios recombinantes, pueden usarse cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica para identificación de ácidos nucleicos que codifican los genes deseados. Puede usarse cualquier método disponible en la técnica para obtener un cADN de longitud completa (es decir que abarca la región codifica completa) o ADN genómico que codifica la enzima PH20 deseada, tal como de una

fuente de célula o tejido. Las variantes o modificaciones, incluyendo formas truncadas tales como las proporcionadas en la presente, pueden producirse por ingeniería a partir de un polipéptido de tipo natural usando métodos de ADN recombinante estándar.

Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquiera de los métodos disponibles conocidos en la técnica para clonación y aislado de moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen amplificación PCR de ácidos nucleicos y selección de colecciones, incluyendo selección de hibridización de ácido nucleico, selección basada en anticuerpo y selección basada en actividad.

Pueden usarse métodos para amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR). La PCR puede llevarse a cabo usando cualquiera de los métodos o procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen el uso de un ciclizador térmico Perkin-Elmer Cetus y polimerasa Taq (Gene Amp). Puede usarse un ácido nucleico que contiene material como el material de partida del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido deseada. Por ejemplo, preparaciones de ADN y mARN, extractos celulares, extractos de tejido de una fuente apropiada (por ejemplo testículos, próstata, mama), muestras de fluido (*por ejemplo* sangre, suero, saliva), muestras de sujetos saludables y/o enfermos pueden usarse en los métodos de amplificación. La fuente puede ser de cualquier especie eucariótica incluyendo, pero no limitado a, vertebrado, mamífero, humano, porcino, bovino, felino, ave, equino, canino, y otras fuentes de primate. También pueden usarse las colecciones de ácido nucleico como una fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, pueden diseñarse los cebadores con base en las secuencias expresadas de las cuales se generan el polipéptido deseado. Los cebadores pueden designarse con

base en una retro-traducción de una secuencia de aminoácido de polipéptido. Si se desea, pueden usarse cebadores degenerados para amplificación. Los cebadores oligonucleótido que hibridizan a secuencias en las terminales 3' y 5' de la secuencia deseada puede usarse como cebadores para amplificarse por secuencias PCR a partir de una muestra de ácido nucleico. Los cebadores pueden usarse para amplificar el PH20 de longitud completa, o una secuencia truncada del mismo, tal como un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos PH20 solubles proporcionados en la presente. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden procesarse en secuencia y confirmarse para codificar un polipéptido deseado.

Las secuencias de nucleótido adicionales pueden unirse a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, incluyendo secuencias ligadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonación del gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de la proteína núcleo que codifica secuencias de ADN. Adicionalmente, las secuencias de nucleótido adicionales que especifican los elementos de ADN funcional pueden ligarse operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteína itnracelular, y las secuencias de secreción, por ejemplo, secuencias de señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Tales secuencias se conocen por aquellos de habilidad en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de señal heterólogas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, secuencias de señal heteróloga IgG kappa de ratón y humano establecidas en SEQ ID NOS:144 y 145, respectivamente. Las secuencias de residuo de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican las regiones de enlace a proteínas también pueden ligarse a las moléculas de ácido nucleico que

codifican la enzima. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la absorción de una enzima en células objetivo específicas, o de otra manera alteran la farmacocinética de un producto de un gen sintético.

Además, pueden agregarse etiquetas u otras porciones, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, las secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta de epítopo u otro marcador detectable también pueden ligarse a moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima. Los ejemplos de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO:142) o Etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO:143).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden insertarse en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas vector-hospedero conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debiera ser compatible con la célula hospedera usada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en la presente (establecido en SEQ ID NO:140). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, realizarse al ligar el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene terminaciones cohesivas complementarias. Si los sitios de restricción complementarios usados para el fragmento del ADN no se presentan en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede producirse al ligar secuencias de nculeótido (ligadores) en las

terminales de ADN; estos ligadores ligados pueden incluir oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector de escisión y el gen de proteína pueden modificarse por formación de extremo homopolimérico. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA).

Las moléculas recombinantes pueden introducirse en las células hospederas por medio, por ejemplo, de transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de manera que se generan muchas copias de la secuencia de genes. En modalidades específicas, la transformación de células hospederas con moléculas de ADN recombinantes que incorporan el gen de proteína aislado, cADN, o secuencia de ADN sintetizado permite la generación de copias múltiples del gen. De esta manera, el gen puede obtenerse en grandes cantidades por transformantes de crecimiento, aislado de las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado.

Además de la producción recombinante, el PH20 soluble, incluyendo cualquier esPH20 proporcionado en la presente, puede producirse por síntesis de péptido directa usando técnicas de fase sólida (ver por ejemplo, Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc.*, 85:2149-2154). Puede realizarse la síntesis de proteína *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. Puede alcanzarse la síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptido Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Pueden sintetizarse químicamente varios fragmentos de un polipéptido de forma separada y combinarse usando métodos químicos.

1. Vectores y Células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas deseadas, tal como cualquiera de las descritas en la presente, el ácido nucleico que contiene todo o una porción de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden suministrarse por el promotor nativo para genes PH20, y/o sus regiones de flanqueo.

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

Se proporcionan células procarióticas y eucarióticas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células de hongos, Archaea, células de planta, células de insecto y células de animales. Las células se usan para producir una proteína de la misma al hacer crecer las células arriba descritas bajo condiciones por las cuales la proteína codificada se expresa por la célula, y recuperar la proteína expresada. Para propósitos en la presente, por ejemplo, polipéptidos PH20 solubles, incluyendo polipéptidos PH20 solubles extendidos, pueden secretarse en el medio.

La cepa de células hospederas puede elegirse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traducción puede impactar el plegado y/o función del polipéptido.

Diferentes células hospederas, tales como, pero no limitadas a, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 y WI38 tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traducción y pueden elegirse para asegurar la modificación y procesamiento correcto de la proteína introducida. Generalmente, la elección de la célula es una que es capaz de introducir glicosilación ligada a N en el polipéptido expresado. Por lo tanto, se proporcionan las células eucarióticas que contienen los vectores. Las células eucarióticas ejemplares son células de ovario de hámster chino (CHO). Por ejemplo, células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (por ejemplo células DG44) se usan para producir polipéptidos proporcionados en la presente. Notar que la expresión bacteriana de un PH20 soluble extendido o PH20 truncado en el C terminal proporcionado en la presente no resultará en un polipéptido catalíticamente activo, pero cuando se combinación con maquinaria de glicosilación apropiada, el PH20 puede glicosilarse artificialmente.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de hialuronidasa, incluyendo polipéptidos PH20 solubles extendidos y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, acoplados a la secuencia de señal nativa o heteróloga, así como copias múltiples de los mismos. Los vectores pueden seleccionarse para expresión de la proteína de enzima en la célula o de tal manera que la proteína de enzima se expresa como una proteína secretada.

Una variedad de sistemas hospedero-vector pueden usarse para expresar la secuencia de codificación de proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de célula de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus de vacuna, adenovirus y otros virus); sistemas de célula de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como vectores de levadura que contienen levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido, o ADN

cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus resistencias y especificidades. Dependiendo del sistema hospedero-vector usado, puede usarse cualquier de un número de transcripción apropiado y elementos de traducción.

Cualquiera de los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de transcripción/traducción apropiadas y secuencias de codificación de proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinantes in vitro y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, pueden regularse por una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un hospedero transformado con las moléculas de ADN recombinantes. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una modalidad específica, el promotor no es nativo a los genes para una proteína deseada. Los promotores que pueden usarse incluyen pero no se limitan al promotor temprano SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature 290*:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición de terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto *et al. Cell 22*:787-797 (1980)), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneina (Brinster *et al., Nature 296*:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de b-lactamasa (Jay *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:5543) o el promotor *tac* (DeBoer *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80*:21-25 (1983)); ver también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American *242*:79-94 (1980)); vectores de expresión de planta que contienen el promotor de nopalina sintasa (Herrara-Estrella *et al.*,

89

Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor de ARN 35S del virus de mosaico de coliflor (Gardner *et al., Nucleic Acids Res. 9*:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfofato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al., Nature 310*:115-120 (1984)); elementos de promotor de levadura y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol cinasa, el promotor de alcalina fosfatasa, y las siguientes regiones de control de transcripción animal que exhiben especificidad de tejido y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen elastasa I que es activo en células pancreáticas acinares (Swift *et al., Cell 38*:639-646 (1984); Ornitz *et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50*:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); región de control del gen de insulina que es activo en las células beta pancreáticas (Hanahan *et al., Nature 315*:115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina que es activo en células linfoides (Grosschedl *et al., Cell 38*:647-658 (1984); Adams *et al., Nature 318*:533-538 (1985); Alexander *et al., Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987)), región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, de mama, linfoide y mastocitos (Leder *et al., Cell 45*:485-495 (1986)), región de control del gel de albúmina que es activo en el hígado (Pinckert *et al., Genes y Devel. 1*:268-276 (1987)), región de control del gen alfa-fetoproteína que es activo en el hígado (Krumlauf *et al., Mol. Cell. Biol. 5*:1639-1648 (1985); Hammer *et al., Science 235*:53-58 1987)), región de control del gen de antitripsina alfa-1 que es activo en el hígado (Kelsey *et al., Genes y Devel. 1*:161-171 (1987)), región de control del gen de globina beta que es activo en células mieloides (Magram *et al., Nature 315*:338-340 (1985); Kollias *et al., Cell 46*:89-94 (1986)), región de control del gen de proteína básico de mielina que es activo en células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead *et al., Cell 48*:703-712 (1987)), región de control del gen de cadena 2 ligera de miosina que es activo

en el músculo esqueletal (Shani, *Nature 314*:283-286 (1985)), y región de control del gen de hormona que libera la gonadotropina que es activo en gonadotrofos del hipotálamo (Mason *et al.*, *Science 234*:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, el vector se usa de manera que contenga un promotor ligado operablemente a ácidos nucleicos que codifican la proteína PH20, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, del mismo, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia al antibiótico). Dependiendo del sistema de expresión, las señales de inicio específicas también se requieren para traducción eficiente de una secuencia PH20. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos donde el codón de inicio y las secuencias cadena arriba de PH20 o formas solubles de los mismos se insertan en el vector de expresión apropiado, no se necesitan señales de control de traducción adicionales. En casos donde sólo la secuencia de codificación, o una porción de la misma se inserta, debieran proporcionarse las señales de control transcripción exógena que incluyen el codón de inicio ATG. Adicionalmente, el codón de inicio debiera estar en la estructura de lectura correcta para asegurar la transcripción del inserto completo. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de inicio pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede aumentarse por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (Scharf et al. (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol,* 153:516-544).

Los vectores plásmidos ejemplares para transformación de células de E.coli, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; ver también literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor T5 fago (reconocido por polimerasa de ARN de *E. coli*) y un

módulo de represión de operador lac doble para proporcionar la expresión de alto nivel, estrechamente regulada, de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de enlace ribosomal sintético (RBS II) para traducción eficiente, una secuencia de codificación de etiqueta 6XHis, terminadores de transcripción t_0 y T1, origen de replicación ColE1, y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una etiqueta 6xHis ya sea en la terminal N o C de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan sitios de clonación múltiples para las tres estructuras de lectura y proporcionan la expresión de proteínas etiquetadas con 6xHis de terminal N. Otros vectores plásmidos ejemplares para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (ver, patente E.U.A. 4,952,496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; ver, también literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador lac de *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder His-Tag™ para uso en la purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región del promotor T7-lac y el terminador T7.

El ejemplo de un vector para expresión de célula de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se derivó de la columna de vector pCI (Promega). Contiene ADN que codifica el gen de resistencia a beta-lactamasa (AmpR), un origen F1 de replicación, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía de SV40 (SV40). El vector de expresión tiene un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen (DHFR) de dihidrofolato reductasa de

ratón. Las células transfectadas con tal vector pueden cultivarse en medio químicamente definido en ausencia de hipoxantina y timidina, seguido por amplificación del gen adicional con concentraciones incrementadas de metotrexato. Tales métodos se describen en la presente en los Ejemplos 13 y 15.

2. Expresión

Los polipéptidos PH20, incluyendo polipéptidos esPH20 y polipéptidos PH20 truncados de terminal C proporcionados en la presente, pueden producirse por cualquier método conocido por aquellos de habilidad en la técnica incluyendo métodos in vivo e in vitro. Las proteínas deseadas pueden sobreexpresarse en cualquier organismo apropiado para producir las cantidades requeridas y formas de las proteínas, tales como por ejemplo, las necesarias para la administración y tratamiento. Los hospederos de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas de célula de humano y animales transgénicos. Los hospederos de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteína así como los tipos de modificación post-traducción que se presentan en las proteínas expresadas. La elección del hospedero de expresión puede hacerse con base en estos y otros factores, tales como consideraciones regulatorias y de seguridad, costos de producción y la necesidad y métodos para purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y se conocen por aquellos expertos en la técnica y pueden usarse para expresión de proteínas. La elección del vector de expresión estará influenciada por la elección del sistema de expresión hospedero. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores de transcripción y opcionalmente potenciadores, señales de traducción, y señales de terminación de transcripción y traducción. Los vectores de expresión que se usan para transformación estable típicamente tienen un marcador

seleccionable que permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, un origen de replicación puede usarse para amplificar el número de copia del vector.

Los polipéptidos de hialuronidasa solubles, incluyendo esPH20, y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, también pueden utilizarse o expresarse como fusiones de proteína. Por ejemplo, una fusión de enzima puede generarse al agregar funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión de enzima incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia de señal, una etiqueta tal como para localización, *por ejemplo* una etiqueta his_6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST, una secuencia para dirigir la secreción de proteína y/o asociación de membrana y otras secuencias usadas para incrementar la vida media tal como una fusión Fc.

Para producción de alto rendimiento, de larga duración de proteínas recombinantes, se desea la expresión estable. Por ejemplo, las líneas de célula que expresan establemente un PH20 soluble, tal como un esPH20, u otro polipéptido PH20 truncado de terminal C, puede transformarse usando vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, las células pueden permitirse que crezcan por 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Las células resistentes de células establemente transformadas pueden proliferarse usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para los tipos de células.

Cualquier número de sistemas de selección pueden usarse para recuperar líneas de célula transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, la timidina cinasa del virus simple del herpes (Wigler M et

al. (1977) *Cell*, 11:223-32) y genes de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy I et al. (1980) *Cell*, 22:817-23), que pueden emplearse en células TK- o APRT-, respectivamente. También, puede usarse la resistencia al antimetabolito, antibiótico o herbicida como la base para selección. Por ejemplo, DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler M et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci,* 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a la neomicina aminoglicósidos y G-418 (Colbere-Garapin F et al. (1981) *J. Mol. Biol.,* 150:1-14); y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfuron y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente, pueden usarse. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptofano o hisD, lo que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman SC and RC Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci,* 85:8047-51). Los marcadores visibles, tal como pero no limitado a, antocianinas, beta glucuronidasa y sus sustratos, GUS, y luciferasa y su luciferina sustrato, también pueden usarse para identificar transformantes y también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable que se atribuye a un sistema vector particular (Rhodes CA et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

La presencia y expresión de polipéptidos PH20 solubles, incluyendo esPH20, y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, puede vigilarse. Por ejemplo, la detección de un polipéptido funcional puede determinarse al probar el medio acondicionado para actividad de enzima hialuronidasa bajo condiciones apropiadas. La sección G enseguida proporciona ensayos ejemplares para evaluar la solubilidad y actividad de proteínas expresadas.

a. Células Procarióticas

Las procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E.*

coli es una técnica sencilla y rápida bien conocida por aquellos de experiencia en la técnica. Los vectores de expresión para *E.coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteína y para expresar proteínas que exhiben algo de toxicidad a las células hospederas. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores T7 y SP6 de ARN y el promotor λPL que regula la temperatura.

Las proteínas, tal como cualquiera de las proporcionadas en la presente, pueden expresarse en el ambiente citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente reductor y para algunas moléculas, esto puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes de reducción tal como ditiotreotol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea pueden usarse para volver a solubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de la bacteria que proporciona un ambiente oxidante y tipo chaperonina e isomerasas de disulfuro y puede llevar a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona a la proteína a expresarse lo que dirige a la proteína al periplasma. El líder se remueve entonces por peptidasas de señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder dirigidas al periplásmico incluyen el líder pelB del gen de pectato liasa y el líder derivado del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite una purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan pueden obtenerse del periplásma por lisis osmótica. Igual que la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y desnaturalizadas y pueden usarse agentes de reducción para facilitar la solubilizaración y re-plegado. La temperatura de la inducción y crecimiento también puede

tener influencia en los niveles de expresión y solubilidad, se usan típicamente temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, la bacteria produce proteínas aglicosiladas. De esta manera, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, puede agregarse la glicosilación *in vitro* después de la purificación a partir de células hospederas.

b. Células de Levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolitica, Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospederos de expresión de levadura bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas, tales como cualquiera de las descritas en la presente. La levadura puede transformarse con vectores replicantes episomales o por integración cromosomal estable por recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión de genes. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneina, tales como CUP1, AOX1 u otros *Pichia* u otro promotor de levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son a menudo solubles. La co-expresión con chaperoninas tales como Bip y disulfuro de isomerasa de proteína puede mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse para secreción usando fusiones de péptido de señal de secreción tales como la levadura que empareja la señal de secreción tipo factor alfa de *Saccharomyces cerevisae* y fusiones con proteínas de superficie de célula de levadura tal como el receptor de adhesión que empareja Aga2p o la glucoamilasa *Arxula adeninivorans*. Un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2, puede producirse por ingeniería para remover las secuencias fusionadas de los polipéptidos

expresados como si salieran de la trayectoria de secreción. La levadura también es capaz de glicosilación en las porciones Asn-X-Ser/Thr.

c. Células de insecto

Las células de insecto, particularmente que usan expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones post-traducción usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo hospedero restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina del baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen los baculovirus tales como el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV, por sus siglas en inglés), y el virus de polihedrosis nuclear *bombyx mori* (BmNPV, por sus siglas en inglés) y una línea de célula de insecto tal como Sf9 derivado de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótido de la molécula a expresarse se fusiona inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamífero se procesan exactamente en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas de célula *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de célula de mamífero. Las células de insecto ejemplares son aquellas que se han alterado para reducir la inmunogenicidad, incluyendo aquellas con vectores de expresión de baculovirus "tipo mamífero" y aquellas que carecen de la enzima FT3.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células establemente transformadas. Las líneas de célula tales como las células Schnieder 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*) pueden usarse para expresión. El promotor de metalotioneina de *Drosophila* puede usarse para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metal pesado con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente por el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamíferos pueden usarse para expresar proteínas incluyendo polipéptidos de hialuronidasa solubles. Los constructos de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección vírica tal como adenovirus o por transferencia de ADN directa tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tal como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero típicamente incluyen un sitio de tapa de mARN, una caja TATA, una secuencia de inicio de traducción (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. También pueden agregarse elementos IRES para permitir la expresión bicistrónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores a menudo incluyen promotores-potenciadores transcripcionales para expresión de alto nivel, por ejemplo el promotor-potenciador SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición de terminal larga del virus de sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de célula. También pueden usarse regiones promotoras y potenciadoras tipo tejido y célula para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras incluyen, pero no se limitan a, aquellas de los genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor de mamífero de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, alfa 1

antitripsina, beta globina, proteína básica de mielina, cadena 2 ligera de miosina, y control del gen de hormona de liberación gonadotrópica. Los marcadores seleccionables pueden usarse para seleccionar y mantener células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes de marcador seleccionables incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglicosido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Por ejemplo, la expresión puede realizarse en presencia de metotrexato para seleccionar sólo aquellas células que expresan el gen DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tales como TCR-ζ y $Fc_{\varepsilon}RI$-γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas de célula para expresión de mamíferos incluyendo células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas de célula ejemplares incluyen pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretada) y otras líneas de célula de mieloma, líneas de célula de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB. Las líneas de célula también están disponibles adaptadas a medio libre de suero que facilita la purificación de proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) y la línea celular EBNA-1 libre de suero (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng. 84*:332-42.). Las líneas de célula también están disponibles que se adaptan a crecer en medio especiales optimizados para expresión máxima. Por ejemplo, las células CHO DG44 se adaptan a crecer en cultivo de suspensión en un medio libre de producto animal, químicamente definido.

e. Plantas

Pueden usarse células de plantas transgénicas y plantas para expresar proteínas tales como cualquiera de las descritas en la presente. Los constructos de expresión se transfieren típicamente a las plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo de microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacteria. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación transcripcional y elementos de control de traducción. Los vectores de expresión y técnicas de transformación se dividen usualmente entre hospederos dicotiledóneos, tal como *Arabidopsis* y tabaco, y hospederos monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Los ejemplos promotores de planta usados para expresión incluyen el promotor del virus de mosaico de coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bifosfato de carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa a menudo se usan para facilitar la selección y mantenimiento de células transformadas. Las células de planta transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerado en plantas enteras. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas producidas por ingeniería para producir polipéptidos hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes que las células de mamífero, esto puede tener influencia en la elección de la proteína producida en estos hospederos.

3. Técnicas de Purificación

Las células hospederas transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica un PH20 soluble, incluyendo esPH20, y otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, pueden cultivarse bajo condiciones apropiadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula

recombinante se secreta generalmente, pero puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector usado. Como se entenderá por aquellos de experiencia en la técnica, los vectores de expresión que contienen PH20 que codifica el ácido nucleico pueden diseñarse con secuencias de señal que facilitan la secreción directa de PH20 a través de la membrana de célula procariótica y eucariótica.

De esta manera, el método para purificación de polipéptidos de células hospederas dependerá de las células hospederas elegidas y los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente de medio de cultivo después de remover las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse del extracto. Cuando los organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos se usan para expresión, los tejidos u órganos pueden usarse como el material de partida para hacer un extracto celular lisado. Adicionalmente, la producción de animal transgénico puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que puede colectarse, y si es necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse además usando métodos estándar en la técnica.

Las proteínas, tales como polipéptidos PH20 solubles, incluyendo polipéptidos esPH20, u otros polipéptidos PH20 truncados de terminal C, pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en el arte incluyendo pero no limitadas a, SDS-PAGE, cromatografía de fraccionado de tamaño y exclusión de tamaño, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio de aniones. Las técnicas de purificación por afinidad también pueden utilizarse para mejorar la eficiencia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, los anticuerpos, receptores y otras moléculas que enlazan las enzimas de hialuronidasa PH20 pueden usarse en purificación por afinidad. Por ejemplo, el PH20 soluble puede purificarse del medio de acondiconamiento.

Los constructos de expresión también pueden producirse por

ingeniería para agregar una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítopo myc, fusión GST o His_6 y purificación por afinidad con el anticuerpo myc, resina de glutatión y resina Ni, respectivamente. Tales etiquetas pueden unirse a la secuencia de nucleótido que codifica un PH20 soluble como se describe en otro lugar en la presente, lo que facilita la purificación de proteínas solubles. Por ejemplo, el PH20 soluble puede expresarse como una proteína recombinante con uno o más dominios de polipéptido adicionales agregados para facilitar la purificación de proteína. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tal como módulos de histidina-triptofano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle Wash.). La inclusión de una secuencia ligadora de escisión tal como Factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido PH20 expresado es útil para facilitar la purificación. Uno de tal vector de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un PH20 soluble y contiene ácido nucleico que codifica 6 residuos de histidina seguido por tioredoxina y un sitio de escisión de enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de iones de metal inmovilizados), aunque el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido de la proteína de fusión.

Puede evaluarse la pureza por cualquier método conocido en la técnica que incluye electroforesis en gel, métodos CLAR ortogonales, teñido y técnicas espectrofotométricas. La proteína expresada y purificada puede analizarse usando cualquier ensayo o método conocido por aquellos de experiencia en la técnica, por ejemplo, cualquiera descrito en la Sección G. estos incluyen ensayos basados en las

propiedades físicas y/o funcionales de la proteína, incluyendo, pero no limitado a, análisis por electroforesis en gel, inmunoensayo y ensayos de actividad de hialuronidasa.

Dependiendo del sistema de expresión y células hospederas usadas, el polipéptido resultante puede ser heterólogo debido a las peptidasas presentes en el medio de cultivo durante la producción y purificación. Por ejemplo, el cultivo de PH20 soluble en células CHO puede resultar en una mezcla de polipéptidos heterogéneos. Un protocolo ejemplar para la generación, producción y purificación de un PH20 soluble (por ejemplo rHuPH20) se describe en los Ejemplos 13-15 enseguida. Similarmente, por ejemplo, la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos 36-497 establecida en SEQ ID NO:60, puede resultar en una mezcla heterogénea de polipéptidos que incluyen variablemente polipéptidos que terminan en 497, 496, 495, 494, 493, 492, 491, 490, 489 o más cortos.

F. Preparación, Formulación y Administración de Polipéptidos PH20 Solubles Extendidos, y Otros Polipéptidos PH20 solubles

Las composiciones farmacéuticas de polipéptidos PH20 solubles, incluyendo esPH20, son proporcionadas en la presente para administración. Los polipéptidos PH20 solubles pueden formularse de forma separada, o pueden co-formularse o co-administrarse con formulaciones farmacéuticas de otros agentes terapéuticos, por ejemplo, como se describe en la Sección G. Los compuestos pueden formularse en preparaciones farmacéuticas apropiadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elíxires, para administración oral, así como preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. Típicamente, los compuestos se formulan en las composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Ansel *Introduction to*

Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126).

Típicamente, se contempla una dosificación terapéuticamente efectiva. La cantidad de un PH20 soluble seleccionable a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o afección puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la enzima particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratarse y la seriedad de la enfermedad.

Por lo tanto, se entiende que la dosificación y duración precisa del tratamiento es una función de la enfermedad a tratarse y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba o por extrapolación de los datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Se nota que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la severidad de la afección a aliviar. Se entiende además que para cualquier objetivo particular, los regímenes de dosificación específicos debieran ajustarse con el tiempo de acuerdo a la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente sólo son ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o uso de las composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden administrarse por horas, diariamente, semanalmente, mensualmente, al año o una vez. Generalmente, los regímenes de dosificación se eligen para toxicidad limitada. Se notará que el médico que atiende debería conocer cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosificación inferior debido a la toxicidad, o disfunción de médula ósea, hígado o riñón u otro tejido. A la inversa, el médico que atiende también debiera conocer cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no es adecuada (descartando efectos colaterales tóxicos).

Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de aprobaciones por una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en humanos. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir portadores estándar tal como grados farmacéuticos of mannitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y otros de tales agentes. La formulación debiera ajustarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra un PH20 soluble. Los ejemplos de portadores farmacéuticos apropiados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad apropiada de portador de manera que se proporciona la forma de administración apropiada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de fríjol de soya, aceite mineral, y aceite de ajonjolí. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas

naturales, tal como goma de acacia, gelatina, glucosa, melaza, polivinilpirrolidina, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes tales como aquellos conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes apropiados incluyen almidón, glicosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada, glicerol, propilenglicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes amortiguadores de pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitan, acetato de trietanolamina de sodio, oleato de trietanolamina, y otros de tales agentes.

Las formulaciones de compuestos farmacéuticamente activos de forma terapéutica y derivados de los mismos se proporcionan para administración a humanos y animales en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Por ejemplo los compuestos pueden formularse como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones aceite en agua que contienen cantidades apropiadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampolletas y jeringas y comprimidos o cápsulas individualmente empacados. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiples de los mismos. La forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas empacadas en un recipiente sencillo a administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, botellas de comprimidos o cápsulas o botellas de

pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiple de dosis unitarias que no se segregan en el empaque. Generalmente, pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0.005% hasta 100% con el balance hecho de un portador no tóxico.

Las composiciones proporcionadas en la presente típicamente se formulan para administración por vía subcutánea, aunque se contemplan otras vías de administración, tales como cualquier vía conocida por aquellos de experiencia en la técnica incluyendo inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intralesional, intraperitoneal, epidural, vaginal, rectal, local, óptico, administración transdérmica o cualquier vía. Las formulaciones apropiadas para tales vías se conocen por aquellos expertos en la técnica. La administración puede ser local, tópica o sistémica, dependiendo de la ubicación de tratamiento. La administración local a un área que necesita de tratamiento puede alcanzarse por, por ejemplo, pero no limitado a, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunto con una venda para 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 administrarse con otros agentes biológicamente activos, ya sea secuencialmente, intermitentemente o en la misma composición.

La vía más apropiada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad, la tolerancia del sujeto a una vía de administración particular, la severidad de la enfermedad, y la composición particular que se usa. Típicamente, las composiciones proporcionadas en la presente se administran parenteralmente. En algunos ejemplos, se administran las composiciones PH20 solubles de manera que alcanzan el intersticio de la piel o tejidos, por ello degradando el espacio intersticial para suministro subsecuente de un agente terapéutico. De esta manera, en

algunos ejemplos, se contempla la administración directa bajo la piel, tal como por métodos de administración subcutánea. De esta manera, en un ejemplo, la administración local puede alcanzarse por inyección, tal como desde una jeringa u otro artículo fabricado que contiene un dispositivo de inyección talo como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede alcanzarse por infusión, que puede facilitarse por el uso de una bomba u otro sistema similar. Otros modos de administración también se contemplan. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

Los métodos de administración pueden emplearse para reducir la exposición de polipéptidos PH20 solubles a procesos degradantes, tal como degradación proteolítica e intervención inmunológica por medio de respuesta antigénica e inmunogénica. Los ejemplos de tales métodos incluyen administración local al sitio de tratamiento. La pegilación de terapéuticos se ha reportado para incrementar la resistencia a la proteólisis, incrementar la vida media en plasma, y reducir la antigenicidad e inmunigenicidad. Los ejemplos de metodologías de pegilación se conocen en la técnica (ver por ejemplo, Lu and Felix, *Int. J. Peptide Protein Res., 43*: 127-138, 1994; Lu and Felix, *Peptide Res., 6:* 142-6, 1993; Felix *et al., Int. J. Peptide Res., 46*: 253-64, 1995; Benhar *et al., J. Biol. Chem., 269*: 13398-404, 1994; Brumeanu *et al., J Immunol., 154*: 3088-95, 1995; ver también, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10)*:1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2)*:3S-8S). La pegilación también puede usarse en el suministro de moléculas de ácido nucleico *in vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede incrementar la estabilidad y transferencia de genes (ver, por ejemplo, Cheng *et al.* (2003) *Pharm. Res. 20(9)*: 1444-51).

1. Inyectables, soluciones y emulsiones

Se contempla en la presente la administración parenteral, caracterizada generalmente por inyección o infusión, ya sea subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente o intradérmicamente. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas solidas apropiadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones farmacéuticas pueden contener otras cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tal como agentes humectantes o emulsificantes, agentes amortiguadores del pH, estabilizantes, potenciadores de solubilidad, y otros de tales agentes, tal como por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio, monolaurato de sorbitan, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. El implante de un sistema de liberación retardado o liberación sostenida, de tal manera que se mantenga un nivel constante de dosificación (ver, por ejemplo, Patente E.U.A. No. 3,710,795) también se contempla en la presente. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales depende altamente de la naturaleza específica del mismo, así como la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Para propósitos en la presente, se desea la administración local para administración directa al intersticio afectado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, los productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipotérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser ya sea acuosas o no acuosas. Si se administra intravenosamente, los portadores apropiados incluyen solución salina

fisiológica o solución salina amortiguada en fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, y polipropilen glicol y mezclas de los mismos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, amortiguadores, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsificantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringers, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y Ringers lactada. Los vehículos parenterales no acuosos que incluyen aceites fijos de origen vegetal en concentraciones bacterioestáticas o fungistáticas pueden agregarse a las preparacioens parenterales empacadas en recipientes de dosis múltiples, que incluyen fenoles o cresoles, merciales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los amortiguadores incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsificantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones de metal incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilen nglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de manera que una inyección o infusión proporciona una cantidad

efectiva para producir el efecto farmacológico deseado, tal como control glicémico. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden empacarse en, por ejemplo, una ampolleta, un cartucho, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida o preparación en polvo reconstituida, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, es una función de la enfermedad a tratarse y el artículo particular de fabricación elegido para empaque. Todas las preparaciones para administración parenteral deberán ser estériles, como se conoce y practica en la técnica.

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 proporcionarse como una preparación concentrada a diluirse hasta una concentración terapéuticamente efectiva antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (*por ejemplo*, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (*por ejemplo*, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (*por ejemplo*, aceite de almendras, ésteres grasos, o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (*por ejemplo*, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden presentarse en forma liofilizada para reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes del uso.

Polvos Liofilizados

De interés en la presente son los polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas, estos también pueden reconstituirse y formularse como sólidos o geles.

El polvo liofilizado, estéril se prepara al disolver un compuesto

de enzima inactivo en una solución amortiguadora. La solución amortiguadora puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico de la solución en polvo o reconstituida, preparada del polvo. La filtración estéril posterior de la solución seguido por liofilización bajo condiciones estándar conocidas por aquellos de experiencia en la técnica proporciona la formulación deseada. Brevemente, el polvo liofilizado se prepara al disolver un excipiente, tal como dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente apropiado, en un amortiguador apropiado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro de tal amortiguador conocido por aquellos de habilidad en la técnica. Entonces, se agrega una enzima seleccionada a la mezcla resultante, y se agita hasta que se disuelve. La mezcla resultante se filtra de forma estéril o trata para remover las partículas y para asegurar la esterilidad, y se distribuye en viales para liofilización. Cada vial contendrá una dosificación sencilla o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse bajo condiciones apropiadas, tal como a alrededor de 4°C hasta temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución amortiguadora apropiada proporciona una formulación para uso en administración parenteral.

2. Administración Tópica

Se preparan mezclas tópicas como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elíxires, lociones, suspensiones, tintes, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, rocíos, supositorios, banditas, parches dérmicos o cualquier otra de las formulaciones apropiadas para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los

mismos puede formularse como aerosoles para aplicación tópica, tal como por inhalación (ver, por ejemplo, Patentes E.U.A. Nos. 4,044,126, 4,414,209, y 4,364,923, que describe aerosoles para suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lacto. En tal caso, las partículas de la formulación típicamente tendrán diámetros de menos de 50 micrones, o menos de 10 micrones.

Los compuestos pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y membranas mucosales, tal como en el ojo, en la forma de geles, cremas, y lociones y para aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para suministro transdérmico y también para administración a los ojos o mucosa, o para terapias de inhalación. Las soluciones nasales del compuesto activo solas o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables también pueden administrarse.

Se proporcionan formulaciones apropiadas para administración transdérmica. Pueden proporcionarse en cualquier formato apropiado, tal como parches discretos adaptados para mantenerse en contacto íntimo con la epidermis del receptor por un periodo de tiempo prolongado. Tales parches contienen el compuesto activo en solución acuosa amortiguada opcionalmente de, por ejemplo, concentración 0.1 hasta 0.2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones apropiadas para administración transdérmica también pueden suministrarse por iontoforésis (ver, *por ejemplo*, *Pharmaceutical Research* 3(6):318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa amortiguada opcionalmente del compuesto activo.

3. Composiciones para otras vías de administración

Dependiendo de la condición tratada, también se contemplan en la presente otras vías de administración, tal como aplicación tópica, parches transdérmicos, administración oral y rectal. Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y tabletas para efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o suavizan a temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, cera carbo (polioxietilen glicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse combinaciones de varias bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen esperma de ballena y cera. Pueden prepararse supositorios rectales ya sea por el método de compresión o por moldeo. El peso típico para un supositorio rectal es alrededor de 2 a 3 gm. Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se fabrican usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y por los mismos métodos como para formulaciones para administración oral.

Las formulaciones apropiadas para administración rectal pueden proporcionarse como supositorios de dosis unitaria. Estos pueden prepararse al mezclar el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego formar la mezcla resultante.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables

tales como agentes de enlace (*por ejemplo*, almidón de maíz pregelatinizado, polivinil pirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenadores (*por ejemplo*, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (*por ejemplo*, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (*por ejemplo*, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (*por ejemplo*, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones apropiadas para administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, pastillas para chupar que contienen el compuesto activo en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por formulaciones y/o dispositivos de suministro de liberación controlada (ver, *por ejemplo*, en Patentes E.U.A. Nos. 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 y 5,733,566).

Se conocen varios sistemas de suministro y pueden usarse para administrar polipéptidos PH20 solubles seleccionados, tal como pero no limitado a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos PH20 solubles seleccionados tal como sistemas de suministro de retrovirus.

Por lo tanto, en ciertas modalidades, las liposomas y/o nanopartículas también pueden emplearse con la administración de polipéptidos PH20 solubles. Las liposomas se forman de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también llamadas vesículas

multilamelares (MLVs)). Las MLVs generalmente tienen diámetros desde 25 nm hasta 4 µm. La sonicación de MLVs resulta en la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con diámetros que están en el intervalo de 200 hasta 500 angstroms que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras diferentes a las liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar del lípido al agua. A relaciones bajas, se forman las liposomas. Las características físicas de las liposomas dependen del pH, resistencia iónica y la presencia de cationes divalentes. Las liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una fase de transición que altera marcadamente su permeabilidad. La fase de transición involucra un cambio de una estructura ordenada, compactada, conocida como estado en gel, a una estructura menos ordenada, libremente compactada, conocida como estado de fluido. Esto se presente en una temperatura de transición de fase característica y resulta en un incremento en la permeabilidad de iones, azúcares y fármacos.

Las liposomas interactúan con células por medio de mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tal como macrófagos y neutrófilos; adsorción de la superficie celular, ya sea por fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas de fuga no específicas, o por interacciones específicas con componentes de superficie celular; fusión con la membrana celular de plasma por la inserción de la bicapa de lípido de la liposoma en la membrana de plasma, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de los lípidos liposomales a las membranas celulares o subcelulares, o al contrario, sin ninguna asociación de los contenidos de liposoma. Al variar la formación de liposoma se puede alterar aquel mecanismo operativo, aunque más de uno puede operar al mismo tiempo. Las nanocápsulas pueden atrapar

generalmente compuestos en una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos laterales debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (tamaño alrededor de 0.1 µm) debieran diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cubren estos requerimientos se contemplan para usarse en la presente, y tales partículas pueden hacerse fácilmente.

4. Dosificación y Administración

Los polipéptidos PH20 solubles, incluyendo esPH20, proporcionados en la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas para administración por dosificación sencilla o dosificación múltiple. La enzima seleccionada que degrada el hialuronano se incluye en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos colaterales indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede determinarse empíricamente al probar los polipéptidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tal como al usar los ensayos proporcionados en la presente o conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Taliani et al. (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67; Filocamo et al. (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427; Sudo et al. (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18; Buffard et al. (1995) *Virology*, 209:52-59; Bianchi et al. (1996) *Anal. Biochem.*, 237: 239-244; Hamatake et al. (1996) *Intervirology* 39:249-258; Steinkuhler et al. (1998) *Biochem.*, 37:8899-8905; D'Souza et al. (1995) *J Gen. Virol.*, 76:1729-1736; Takeshita et al. (1997) *Anal. Biochem.*, 247:242-246; ver también por ejemplo, Shimizu et al. (1994) *J. Virol.* 68:8406-8408; Mizutani et al. (1996) *J. Virol.* 70:7219-7223; Mizutani et al. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:822-826; Lu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 93:1412-1417; Hahm et al., (1996) *Virology*, 226:318-326; Ito et al. (1996) *J. Gen. Virol.*, 77:1043-1054; Mizutani et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212:906-911; Cho et al. (1997) *J. Virol. Meth.* 65:201-207 y luego extrapolar los mismos para

humanos.

Típicamente, una dosis terapéuticamente efectiva de una enzima PH20 soluble está en o alrededor de 10 Unidades (U) hasta 500,000 Unidades, 100 Unidades hasta 100,000 Unidades, 500 Unidades hasta 50,000 Unidades, 1000 Unidades hasta 10,000 Unidades, 5000 Unidades hasta 7500 Unidades, 5000 Unidades hasta 50,000 Unidades, o 1,000 Unidades hasta 10,000 Unidades, generalmente 1,000 hasta 50,000 Unidades, en una solución o suspensión estabilizada o una forma liofilizada. Las formulaciones pueden proporcionarse en formas de dosis unitarias tal como, pero no limitado a, ampolletas, jeringas y comprimidos o cápsulas individualmente empacados. El agente dispersante puede administrarse solo, o con otro agente farmacológicamente efectivo o agente terapéutico en un volumen total de 0.1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml, típicamente 10-50 ml.

Por ejemplo, un PH20 soluble, incluyendo esPH20, puede administrarse subcutáneamente en o alrededor de 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2,000 U, 3,000 U, 4,000 Unidades, 5,000 U o más. En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden proporcionarse como una relación de cantidad de un PH20 soluble a un agente terapéutico administrado. Por ejemplo, un polipéptido PH20 soluble puede administrarse a 1 hialuronidasa U/agente terapéutico U (1:1) hasta 50:1 o más, por ejemplo, en o alrededor de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 o más. Típicamente, volúmenes de inyecciones o infusiones de un PH20 soluble contempladas en la presente son desde en o alrededor de 0.01 mL, 0.05 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml o más. El PH20 soluble puede proporcionar una solución madre

en o alrededor de 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/mL, 600 U/mL, 800 U/mL o 1000 U/mL, o puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo en o alrededor de 2000 U/ml, 3000 Unidades/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 8000 U/ml, 10,000 U/mL o 20,000 U/mL para usar directamente o para dilución hasta la concentración efectiva antes del uso. El PH20 soluble puede proporcionarse como una formulación líquida o liofilizada.

5. Empacado, Artículos de Manufactura y Kits

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos PH20 solubles, incluyendo esPH20, o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, o un derivado o variante del mismo puede empacarse como artículos de manufactura que contienen el material de empacado, una composición farmacéutica que es efectiva para tratar una enfermedad o trastorno, y una etiqueta que indica que el PH20 soluble o molécula de ácido nucleico se usa para tratar la enfermedad o trastorno. Las combinaciones de una hialuronidasa PH20 soluble, o derivado o variante del mismo y un agente terapéutico también pueden empacarse en un artículo de manufactura.

Los artículos de manufactura proporcionados en la presente contienen materiales de empaque. Los materiales de empaque para uso en los productos farmacéuticos empacados son bien conocidos por aquellos de experiencia en la técnica. Ver, por ejemplo, Patentes E.U.A Nos. 5,323,907, 5,052,558 y 5,033,252, cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad. Los ejemplos de materiales de empaque farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, empaques en burbujas (blíster), botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas, y cualquier material de empaque apropiado para la formulación seleccionada y el modo pretendido de administración y tratamiento. Los artículos de manufactura pueden incluir una aguja u otro dispositivo de inyección de manera que

facilita la administración (por ejemplo, administración sub-epidérmica) para propósitos de inyección local. Una amplia configuración de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en la presente se contemplan incluyendo un PH20 soluble, tal como un esPH20, y un agente terapéutico conocido para tratar una enfermedad o trastorno particular. La elección de empaque depende del PH20 soluble y/o agente terapéutico, y si tales composiciones se empacarán en conjunto o separadamente. En un ejemplo, el PH20 soluble puede empacarse como una mezcla con el agente terapéutico. En otro ejemplo, los componentes pueden empacarse como composiciones separadas.

Los polipéptidos PH20 solubles seleccionados, tales como polipéptidos esPH20, agentes terapéuticos y/o artículos de manufactura de los mismos pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para administración proporcionado como un artículo de manufactura. Por ejemplo, un polipéptido PH20 soluble puede suministrarse con un dispositivo para administración, tal como una jeringa, un inhalador, una cuchara de dosificación, un gotero, o un aplicador. Las composiciones pueden estar contenidas en el artículo para administración o pueden proporcionarse separadamente para agregarse más tarde. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para aplicación que incluya dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad de la proteasa seleccionada en un sujeto.

G. Ensayos

Los polipéptidos PH20 solubles proporcionados en la presente, incluyendo polipéptidos esPH20, son solubles y mantienen una actividad

enzimática de hialuronidasa. Los polipéptidos PH20 N-glicosilados o parcialmente N-glicosilados proporcionados en la presente mantienen una actividad enzimática de hialuronidasa. La actividad de un PH20 proporcionado en la presente es o está alrededor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más comparada con la actividad de un PH20 correspondiente que no está truncado terminalmente en C o parcialmente N-glicosilado. La actividad de un polipéptido de hialuronidasa PH20 soluble, tal como un esPH20, puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, un ensayo de microturbidez y un ensayo de microtitulación usando ácido hialurónico biotinilado. Puede realizarse la actividad y evaluaciones en medio acondicionado o sobrenadantes o en proteína purificada. La solubilidad de una proteína también puede determinarse, por ejemplo, por un ensayo de separación con Triton® X-114. En todos los ensayos, la actividad o solubilidad de un PH20 soluble puede compararse con un control, por ejemplo, un PH20 de longitud completa que carece de truncamientos de terminal C.

1. Actividad de hialuronidasa

La actividad de un polipéptido PH20 soluble puede evaluarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ensayo USP XXII para hialuronidasa determina actividad indirectamente al medir la cantidad de ácido hialurónico no degradado, o hialuronano, el sustrato (HA) restante después de la enzima se permitió reaccionar con el HA durante 30 min a 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Un Estándar de Referencia de Hialuronidasa (USP, por sus siglas en inglés) o solución de Hialuronidasa Estándar de Formulario Nacional (NF) puede usarse en un ensayo para establecer la actividad, en unidades, de cualquier hialuronidasa.

En un ejemplo, se mide la actividad usando un ensayo de

microturbidez, como se describe en el Ejemplo 12. Esto es basado en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con albúmina de suero. Se mide la actividad al incubar hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo establecido de tiempo (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitar el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide en 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La disminución en turbidez resulta de la actividad de hialuronidasa en el sustrato de hialuronato de sodio es una medición de la actividad enzimática de hialuronidasa.

En otro ejemplo, se mide la actividad de hialuronidasa usando un ensayo de microtitulación en el cual se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de la incubación con hialuronidasa (ver por ejemplo Frost and Stern (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269, Publicación de Patente de E.U.A. No. 20050260186). En el Ejemplo 4, la actividad de hialuronidasa de hialuronidasa PH20 humana truncada se determina usando ácido hialurónico biotinilado. Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico de ácido hialurónico están biotinilados, y el sustrato de ácido hialurónico biotinilado se acopla covalentemente a una placa de microtitulación. Después de la incubación con hialuronidasa, el sustrato de ácido hialurónico biotinilado residual se detecta usando una reacción de avidina-peroxidasa, y compara con aquel obtenido después de la reacción con estándares de hialuronidasa de actividad conocida. Ya que el sustrato se enlaza covalentemente a la placa de microtitulación, los artefactos tal como desplazamiento dependiente de pH del sustrato biotinilado no ocurren. La sensibilidad permite medición rápida de actividad de hialuronidasa de células cultivadas y muestras biológicas con una variación inter-ensayo de menos de 10%.

Otros ensayos para medir la actividad de hialuronidasa también se

conocen en la técnica y pueden usarse en los métodos de la presente (ver por ejemplo Delpech et al., (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41; Takahashi et al., (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

Muchos ensayos de hialuronidasa se han basado en la medición de la generación de nuevos grupos N-acetilamino reducidos (Bonner and Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13:746-752, 1966), o pérdida de viscosidad (De Salegui et al., *Arch. Biochem. Biophys.*121:548-554, 1967) o turbidez (Dorfman and Ott, *J. Biol. Chem.* 172:367, 1948). Con sustratos purificados todos estos métodos son suficientes para la determinación de la presencia o ausencia de actividad endoglucosamídica.

Los sustratos de glicosaminoglicano sustancialmente purificados también pueden usarse en un Ensayo de Cambio de Gel. Los glicosaminoglicanos se mezclan con PH20 recombinante, tal como un PH20 soluble, para probar la actividad de endoglucosidasa que resulta en un cambio en movilidad del sustrato dentro del gel. Los ejemplares de tales sustratos incluyen, pero no se limitan a, sulfato de condroitina-4 y 6, sulfato de dermatan, sulfato de heparan, que pueden obtenerse de Sigma Chemical. El hialuronano del cordón umbilical humano puede obtenerse de ICN. Por ejemplo, cada sustrato de prueba puede diluirse en o alrededor de 0.1 mg/ml en un intervalo de solución amortiguadora de pH 3.5-7.5. En tal ensayo ejemplar, en o alrededor de 10 µl de muestras de PH20 soluble purificado o medio acondicionado de células que expresan PH20 pueden mezclarse con o alrededor de 90 µl de sustrato de prueba en solución amortiguadora deseada y incubarse durante 3 horas a 37°C. Después de la incubación, las muestras se neutralizan con solución amortiguadora de muestra (Tris EDTA pH 8.0, azul de bromofenol y glicerol) seguido por electroforesis. Los glicosaminoglicanos pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los glicosaminoglicanos pueden detectarse al teñir los geles usando azul Alcian al 0.5% en Ácido Acético Glacial al 3% durante la noche después de desteñir en Ácido acético glacial al 7%. Se determina la

degradación por comparación de movilidad del sustrato en la presencia y ausencia de la enzima.

La actividad de hialuronidasa también puede detectarse por zimografía en gel de sustrato (Guentenhoner et al., 1992, *Matrix* 388-396). En este ensayo una muestra se aplica a un ácido hialurónico que contiene gel de SDS-PAGE y las proteínas en la muestra separadas por electroforesis. El gel luego se incuba en una solución amortiguadora de ensayo de enzima y posteriormente se tiñe para detectar el ácido hialurónico en el gel. La actividad de hialuronidasa se visualiza como una zona aclarada en el gel de sustrato.

La capacidad de un polipéptido PH20 soluble para actuar como un agente de propagación o difusión también puede evaluarse. Por ejemplo, el pigmento azul de tripano puede inyectarse subcutáneamente con o sin un PH20 soluble en la piel lateral de cada lado de los ratones agénicos. El área del pigmento luego se mide, tal como un microcalibrador, para determinar la capacidad de la enzima degradada por hialuronano para actuar como un agente de propagación (Patente de E.U.A. No. 20060104968). El efecto de co-administración de hialuronidasa con otro agente, por ejemplo un agente terapéutico, en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente también puede evaluarse *in vivo* usando modelo animal y/o sujetos humanos, tal como en el establecimiento de una prueba clínica.

La actividad funcional de un PH20 soluble, tal como esPH20 puede compararse y/o normalizarse para una referencia estándar usando cualquiera de estos ensayos. Esto puede hacerse para determinar que una cantidad funcionalmente equivalente de un PH20 es soluble. Por ejemplo, la capacidad de un PH20 soluble para actuar como un agente de propagación o difusión puede evaluarse al inyectar en la piel lateral del ratón con azul de tripano, y la cantidad requerida para alcanzar la misma cantidad de difusión como, por ejemplo, 100 unidades de un Estándar de Referencia de Hialuronidasa, puede determinarse. La

cantidad de PH20 soluble requerida es, por lo tanto, funcionalmente equivalente a 100 unidades de hiauronidasa.

2. Solubilidad

La solubilidad de una hialuronidasa puede determinarse por cualquier método conocido para alguien experimentado en la técnica. Un método para determinar la solubilidad es al dividir el detergente. Por ejemplo, un polipéptido PH20 soluble puede distinguirse, por ejemplo, por su división en la fase acuosa de una solución Triton® X-114 a 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-1607). Por ejemplo, la solubilidad de los polipéptidos PH20 descritos en la presente se evalúa como se describe en el Ejemplo 4. Las hialuronidasas ancladas a la membrana, tal como hialuronidasas ancladas al lípido, incluyendo hialuronidasas ancladas a GPI, se dividirán en la fase rica en detergente, pero se dividirán en la fase acuosa o pobre de detergente después del tratamiento con Fosfolipasa C. La Fosfolipasa C es una enzima que escinde el enlace de fosfo-glicerol encontrado en las proteínas ancladas a GPI. El tratamiento con PLC provocará liberación de proteínas ligadas a GPI de la membrana celular exterior.

Otro método para evaluar la solubilidad es determinar si un polipéptido PH20 está anclado a GPI. Un polipéptido PH20 anclado a GPI se enlaza a la membrana celular y por lo tanto es insoluble. Para determinar si un polipéptido PH20 está anclado a GPI, alguien puede evaluar la solubilidad antes y después de la hidrólisis PLC/PLD, y también usar algoritmos predictivos para identificar una secuencia de señal enlazada de anclaje GPI. Las proteínas ancladas a GPI pueden identificarse por su solubilización después de escisión química o enzimática específica, en conjunto con división del detergente (por ejemplo, en Triton® X-114), reconocimiento de anticuerpo, y etiquetado radioactivo metabólico.

Un método común usado para demostrar que una proteína tiene un

anclaje GPI es su liberación de la superficie celular o su solubilización al tratar con fosfolipasa C específica de GPI derivada de tripanosoma o PI-PLC bacteriana (GPI-PLC). Estas enzimas escinden un diacilglicerol en la membrana y producen el epítopo de glicano inmunoreactivo (CRD) en la proteína, que puede detectarse por técnica Western blot con anticuerpos producidos contra el GPI de tripanosomas. Un problema común con este enfoque especialmente encontrado en células mamíferas es que las lipasas no pueden escindir un anclaje GPI en el cual el inositol está acilado. Esto requiere previo tratamiento con álcali suave para remover el ácido graso en el anillo de inositol. Alternativamente, la fosfolipasa D específica de GPI derivada de suero puede usarse para escindir anclajes GPI. Esta enzima se escinde entre el anillo inositol y la porción de ácido fosfatídico y no se inhibe por acilación de inositol. El ácido hidrofluórico escinde los anclajes GPI entre el anillo inositol y ácido fosfatídico y también escinde las ligaduras de fosfodiéster entre cualquiera de los residuos de fosfoetanolaminas y manosilo. El ácido nitroso diluido es particularmente útil en el estudio de anclajes GPI debido a que se escinde específicamente entre la glucosamina no acetilada y el anillo inositol, liberando el glicano enlazado a la proteína (ahora contiene una porción anhidromanosa de diagnóstico) y fosfatidilinositol. En combinación con anticuerpos CRD, los análisis de composición, radioactivos etiquetados con mio-inositol, etanolamina, glucosamina, manosa, o ácidos grasos y métodos de división de detergente o cromatográficos, estos métodos de degradación representan un conjunto poderoso de herramientas para estudiar anclajes GPI en proteínas.

Varios métodos *in silico* y algoritmos se han desarrollado que pueden usarse para identificar secuencias de consenso de señal enlazadas de anclaje GPI en polipéptidos (ver, por ejemplo Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758, Kronegg and Buloz, (1999);

"Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392); incluyendo aquellos que están fácilmente disponibles en sitios web bioinformáticos, tal como el sitio de herramientas ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). De esta manera, alguien de experiencia en la técnica puede determinar si un polipéptido PH20 contiene una secuencia de señal enlazada de anclaje GPI, y, por lo tanto, si el polipéptido PH20 es una proteína anclada a GPI.

H. Métodos de Tratamiento y Usos de PH20 Soluble Extendido y otro PH20 solubles y Terapia de Combinación

Varias formas de hialuronidasas PH20 se han preparado y aprobado para uso terapéutico en humanos. Por ejemplo, las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animal incluyen Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular ovina purificada, y Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), una hialuronidasa testicular de bovino. El Hylenex® (Halozyme Therapeutics) es una hialuronidasa recombinante humana producida por células de Ovario de Hámster Chino (CHO) genéticamente preparadas por ingeniería que contienen ácido nucleico codificado por rHuPH20 soluble. Los usos terapéuticos aprobados para hialuronidasa incluyen uso como un adyuvante para incrementar la absorción y dispersión de otros agentes terapéuticos, para hipodermoclisis (administración fluida subcutánea), y como un complemento en urografía subcutánea para mejorar la resorción de agentes radiopacos. Además de estas indicaciones las hialuronidasas pueden usarse como un agente terapéutico o cosmético para el tratamiento de enfermedades y afecciones adicionales.

Las hialuronidasas también se han usado para potenciar la actividad de quimioterapéuticos y/o la accesibilidad de tumor a

quimioterapéuticos (Schuller et al., 1991, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 32:173, resumen no. 1034; Czejka et al., 1990, *Pharmazie* 45:H.9). La terapia de combinación con hialuronidasa es efectiva en el tratamiento de una variedad de cánceres incluyendo cáncer de vejiga urinaria (Horn et al., 1985, *J. Surg. Oncol.* 28:304-307), carcinoma de célula escamosa (Kohno et al., 94, *J. Cancer Res. Oncol.* 120:293-297), cáncer de mama (Beckenlehner et al., 1992, *J. Cancer Res. Oncol.* 118:591-596), y cánceres gastrointestinales (Scheithauer et al., 1988, *Anticancer Res.* 8:391-396). La hialuronidasa es efectiva como el único agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama (gliomas) (Solicitud publicada de PCT no. WO88/02261, publicada el 7 de abril de 1988). La administración de hialuronidasa también induce respuesta de tumores resistentes previamente a la quimioterapia del páncreas, estómago, colon, ovarios, y mama (Baumgartner et al., 1988, *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker et al., 1986, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390). Desafortunadamente, los contaminantes y naturaleza no humana de tales hialuronidasas resulta en reacciones anafilácticas.

Además de sus efectos anticáncer indirectos, las hialuronidasas también tienen efectos anticarcinogénicos directos. La hialuronidasa previene el crecimiento de tumores trasplantados en ratones (De Maeyer et al., 1992, *Int. J. Cancer* 51:657-660) e inhibe la formación de tumor sobre la exposición a carcinógenos (Pawlowski et al., 1979, *Int. J. Cancer* 23:105-109; Haberman et al., 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, resumen no. 415).

En particular, la hialuronidasa PH20 puede usarse para tratar afecciones o enfermedades asociadas con hialuronano asociadas con presión de fluido intersticial alta, tal como presión de disco, trastornos proliferativos, tal como cáncer e hiperplasia prostática benigna, y edema. El edema puede resultar de o manifestarse en, por ejemplo, transplante de órgano, apoplejía o trauma del cerebro. Los

trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a, cáncer, proliferación celular del músculo liso, esclerosis sistémica, cirrosis del hígado, síndrome de distensión respiratoria en adultos, cardiomiopatía idiopática, lupus eritematoso, retinopatía, por ejemplo, retinopatía diabética u otras retinopatías, hiperplasia cardiaca, trastornos asociados con el sistema reproductivo, tal como hiperplasia prostática benigna (BPH) y quistes de ovario, fibrosis pulmonar, endometriosis, fibromatosis, harmatomas, linfangiomatosis, sarcoidosis, tumores desmoides. Los cánceres incluyen tumores sólidos y sanguíneos/linfáticos y enfermedad metastática, y tumores no diferenciados. Los tumores susceptibles a tratamiento típicamente muestran expresión celular y/o de estroma de un hialuronano, comparados con un tejido no canceroso del mismo tipo de tejido o comparados con un tumor no metastático del mismo tipo de tumor. Los cánceres incluyen cualquiera de uno o más de cáncer de ovario, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de célula escamosa (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, otros cánceres gástricos, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, cáncer de cerebro y cáncer de colon.

Por lo tanto, las hialuronidasas PH20 tienen usos múltiples, incluyendo y además de su uso como un agente de propagación. La hialuronidasa comúnmente se usa, por ejemplo, para el bloque peribulbar en anestesia local antes de la cirugía oftálmica. La presencia de la enzima previene la necesidad de bloques adicionales y acelera el tiempo del comienzo de la acinesia (pérdida del movimiento del ojo). El bloqueo peribulbar y de sub-Tenon son las aplicaciones más comunes de hialuronidasa para procedimientos oftálmicos. La hialuronidasa también puede promover la acinesia en cirugía cosmética, tal como blefaroplastias y elevaciones de cara. Se entiende que las hialuronidasas de PH20 soluble proporcionadas en la presente, incluyendo hialuronidasas esPH20, pueden usarse en cualquier método de tratamiento o terapia de combinación por el cual una hialuronidasa PH20

se usa (ver por ejemplo, Publicación de E.U.A. Nos. US20040268425; US20050260186; US20060104968; y Solicitud de E.U.A. Nos. De Serie 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 y 12/386,222, incorporadas como referencia en su totalidad). Los usos cosméticos y terapéuticos ejemplares para hialuronidasa se describen a continuación.

1. Uso como un Agente de Propagación y Terapia de Combinación

Como se señala arriba, la hialuronidasa es una sustancia de propagación o difusión que modifica la permeabilidad de tejido conectivo a través de la hidrólisis de ácido hialurónico, un polisacárido encontrado en la sustancia de molido intercelular de tejido conectivo, y de ciertos tejidos especializados, tal como el cordón umbilical y humor vítreo. Cuando no se presenta el factor propagación, los materiales subcutáneamente inyectados, tal como fármacos, proteínas, péptidos y ácido nucleico, se propagan muy lentamente. La co-inyección con hialuronidasa, sin embargo, puede provocar propagación rápida. La velocidad de difusión es proporcional a la cantidad de enzima, y la extensión de difusión es proporcional al volumen de la solución.

El PH20, incluyendo PH20 soluble tal como esPH20 proporcionado en la presente, puede usarse para promover o potencia el suministro de agentes y moléculas a cualquiera de una variedad de tejidos mamíferos *in vivo*. Puede usarse para facilitar la difusión y, por lo tanto, promover el suministro, de agentes farmacológicos de molécula pequeña así como agentes farmacológicos de molécula más grande, tal como proteínas, ácidos nucleicos y ácidos ribonucleicos, y composiciones macromoleculares que pueden contener una combinación de componentes incluyendo, pero no limitado a, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas basadas en lípidos y fármacos (ver por ejemplo Publicación de E.U.A. Nos. US20040268425; US20050260186; y US20060104968). El PH20, incluyendo PH20 soluble tal como esPH20 puede

co-administrarse y/o co-formularse con un agente terapéutico para mejorar la biodisponibilidad así como características farmacocinéticas (PK) y/o farmacodinámicas (PD) de agentes co-formulados o co-administrados. Los parámetros PK/PD que pueden mejorarse al usar PH20 soluble, tal como esPH20, incluyen tales mediciones como C_{max} (la concentración máxima de agente alcanzado después de la absorción en, *por ejemplo*, el torrente sanguíneo), T_{max} (el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima), $T_{1/2}$ (el tiempo requerido para la concentración para caer a la mitad), C_{min} (la concentración mínima de agente después del metabolismo y excreción), AUC (área bajo la curva de concentración contra tiempo, una medición de la cantidad general de biodisponibilidad), las concentraciones en varios tejidos de interés (incluyendo, *por ejemplo*, la velocidad de alcanzar concentraciones deseadas, los niveles generales, y la duración de mantener niveles deseados), y E_{max} (el efecto máximo alcanzado).

Los métodos de tratamiento proporcionados en la presente incluyen terapias de combinación con un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno para el cual el agente terapéutico trata se trata. Cualquier agente terapéutico que alivia y o de otra manera reduce la severidad de una enfermedad o afección puede combinarse con un PH20 soluble proporcionado en la presente con objeto de incrementar la biodisponibilidad de tal agente terapéutico. En particular, los polipéptidos PH20 solubles proporcionados en la presente, tal como esPH20s, pueden usarse en cada una y todas de las combinaciones descritas en las aplicaciones, ver por ejemplo, Publicación de E.U.A. Nos. US20040268425; US20050260186; US20060104968 y Solicitud de E.U.A. Nos. De Serie 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 y 12/386,222 en lugar de la hialuronidasa o enzima que degrada la hialuronidasa descrita.

Los polipéptidos PH20 solubles proporcionados en la presente, en particular polipéptidos esPH20, pueden administrarse antes, posteriormente, intermitentemente o simultáneamente con la preparación

del agente terapéutico. Generalmente, el PH20 soluble se administra antes de, o simultáneamente con, la administración de la preparación del agente terapéutico para permitir el PH20 soluble para degradar el ácido hialurónico en el espacio intersticial. El PH20 soluble puede administrarse en un sitio diferente del sitio de administración de la molécula terapéutica o el PH20 soluble puede administrarse en un sitio el mismo como el sitio de administración de la molécula terapéutica.

Los ejemplos de moléculas y agentes farmacéuticos, terapéuticos y cosméticos que pueden administrarse con hialuronidasa incluyen, pero no se limitan a, un agente quimioterapéutico o anticáncer, un agente analgésico, un agente antibiótico, un agente anti-inflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente amebicida, un agente tricomonocida, un agente anti-parkinson, un agente anti-palúdico, un agente anticonvulsivo, un agente anti-depresivo, un agente anti-artrótico, un agente anti-hongos, un agente antihipertensivo, un agente antipirético, un agente anti-parásitos, un agente antihistamina, un agente agonista alfa-adrenérgico, un agente bloqueador alfa, un agente anestésico, un agente dilatador bronquial, un agente biocida, un agente bactericida, un agente bacteriostático, un agente bloqueador adrenérgico beta, un agente bloqueador del canal de calcio, un agente de fármaco cardiovascular, un agente anticonceptivo, un agente cosmético o estético, un agente descongestionante, un agente diurético, un agente depresor, un agente de diagnóstico, un agente de electrolito, un agente hipnótico, un agente de hormona, un agente hiperglicémico, un agente relajante del músculo, un agente que contrae el músculo, un agente oftálmico, un agente parasimpatomimético, un agente estimulante psíquico, un agente sedante, un inductor de sueño, un agente simpatomimético, un agente tranquilizador, un agente urinario, un agente vaginal, un agente viricida, un agente de vitamina, un agente anti-inflamatorio no esteroidal, o un agente inhibidor de enzima convertido en angiotensina, y cualquier combinación de los mismos. En

particular, los agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, bisfosfonatos, insulinas e inmunoglobulinas.

Por ejemplo, los agentes antibióticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Aminoglicósidos; Anfenicoles; Ansamicinas; Carbacefemos; Carbapenemos; Cefalosporinas o Cefemos; Cefamicinas; Clavamos; lipopéptidos Cíclicos; Diaminopirimidinas; Cetolidos; Lincosamidas; Macrólidos; Monobactamos; Nitrofuranos; Oxacefemos; Oxazolidinonas; Penemos, tienamicinas y beta-lactamas misceláneas; Penicilinas; antibióticos de Polipéptidos; Quinolonas; Sulfonamidas; Sulfonas; Tetraciclinas; y otros antibióticos (tales como Clofoctoles, ácidos Fusídicos, Hexedinas, Metenaminas, Nitrofurantoínas Nitroxolinas, Ritipenemos, Taurolidinas, Xibomoles).

También incluidos entre los agentes terapéuticos ejemplares son modificadores sanguíneos tal como factores antihemofílicos, complejos coagulantes anti-inhibidores, antitrombina IIIs, Factor de coagulaciones Vhs, Factor de coagulación VIIIs, Factor de coagulación IXs, fracciones de la proteína de plasma, factores von Willebrand; agentes antiplaqueta (incluyendo, por ejemplo, abciximab, anagrelidas, cilostazoles, bisulfatos de clopidogrel, dipiridamoles, epoprostenoles, eptifibatidas, tirofibanos; factores que estimulan la colonia (CSFs) (incluyendo, por ejemplo, CSFs de Granulocito y CSFs de Macrófago de Granulocito); estimuladores de eritropoyesis (incluyendo, por ejemplo, eritropoyetinas tal como Darbepoetinas Alfa) y epoetina alfas; hemostáticos y albúminas (incluyendo, por ejemplo, aprotininas, combinaciones de factores antihemofílicos y plasma, Acetatos de Desmopresina, y albúminas); inmunoglobulinas, así como globulinas inmunitarias de hepatitis B; inhibidores de trombina (incluyendo por ejemplo inhibidores de trombina directa y lepirudina), y drotecogin alfas; anticoagulantes (incluyendo, por ejemplo, dalteparinas, enoxaperinas y otras heparinas, y warfarinas).

Otros agentes terapéuticos ejemplares que pueden combinarse por

co-administración y/o co-formulación con un PH20 soluble, tal como un esPH20, incluyen, pero no se limitan a, Adalimumab, Agalsidasa Betas, Alefaceptos, Ampicilinas, Anaquinras, Vacunas Antipoliomielíticas, Anti-Timocitos, Azitromicinas, Becaplerminas, Caspofunginas, Cefazolinas, Cefepimas, Cefotetanos, Ceftazidimas, Ceftriaxonas, Cetuximabs, Cilastatinas, Ácidos Clavulánicos, Clindamicinas, Darbepoetin Alfas, Deaclizumabs, Difteria, antitoxinas de Difteria, Difteria Toxoides, Efalizumabs, Epinefrinas, Eritropoyetina Alfas, Etanerceptos, Filgrastimos, Fluconazoles, Hormonas que Estimulan el Folículo, Folitropina Alfas, Folitropina Betas, Fosfeniloinas, Gadodiamidas, Gadopentetatos, Gatifloxacinas, Glatirámeros, los GM-CSF, Goserelinas, acetatos de Goserelina, Granisetronas, *Haemophilus Influenza* B, Haloperidoles, vacunas de Hepatitis, vacunas de Hepatitis A, vacunas de Hepatitis B, Ibritumomab Tiuxetanos, Ibritumomabs, Tiuxetanos, Inmunoglobulinas, vacunas de Hemophilus, vacunas del Virus de Influenza, Infliximabs, Insulinas, Glarginas de Insulina, Interferones, Interferones alfa, Interferones Beta, Interferones Gamma, Interferones alfa-2a, Interferones alfa-2b's, Interferones alfa-1, Interferones alfa-n3, Interferones Beta, Interferones Beta-1a, Interferones Gamma, Interferones alfa-consenso, Iodixanoles, Iohexoles, Iopamidoles, Ioversoles, Quetorolacos, Laronidasas, Levofloxacinas, Lidocaínas, Linezolidos, Lorazepams, Vacunas de Sarampión, virus del Sarampión, virus de las Paperas, Vacunas del Virus Sarampión-Paperas-Rubeola, Vacunas de la Rubeola, Medroxiprogesteronas, Meropenemos, Metilprednisolonas, Midazolamos, Morfinas, Octreotidos, Omalizumabs, Ondansetronas, Palivizumabs, Pantoprazoles, Pegaspargasas, Pegfilgrastimos, Peg-Interferones Alfa-2a, Peg-Interferones Alfa-2b, Pegvisomantos, Vacunas de Pertussis, Piperacilinas, Vacunas de Neumococo y Vacunas del Conjugado de Neumococo, Prometazinas, Reteplasas, Somatropinas, Sulbactamas, Sumatriptanos, Tazobactamas, Tenecteplasas, Toxoides Purificados de Tétanos, Ticarcilinas,

Tositumomabs, Triamcinolonas, Acetónidos de Triamcinolona, hexacetónidos de Triamcinolona, Vancomicinas, inmunoglobulinas de Varicela Zoster, vacunas de Varicela, otras vacunas, Alemtuzumabs, Alitretinoinas, Alopurinoles, Altretaminas, Amifostinas, Anastrozoles, Arsénicos, Trióxidos Arsénicos, Asparaginasas, vacunas de Bacillus de Calmette y Guerin (BCG, por sus siglas en inglés), BCG Live, Bexarotenos, Bleomicinas, Busulfanos, Busulfán intravenoso, orales de Busulfán, Calusteronas, Capecitabinas, Carboplatinas, Carmustinas, Carmustinas con Polifeprosanos, Celecoxibs, Clorambucilos, Cisplatinas, Cladribinas, Ciclofosfamidas, Citarabinas, liposomales de Citarabina, Dacarbazinas, Dactinomicinas, liposomales de Daunorubicina, Daunorubicinas, Daunomicinas, Denileucina Diftitoxas, Dexrazoxanos, Docetaxeles, Doxorubicinas, liposomales de Doxorubicina, propionatos de Dromostanolona, solución B de Elliott, Epirubicinas, Epoyetinas alfa, Estramustinas, Etoposidos, fosfatos de Etóposido, Etopósidos VP-16, Exemestanos, Floxuridinas, Fludarabinas, Fluorouracilos, 5-Fluorouracilos, Fulvestrantes, Gemcitabinas, Gemtuzumabs, Ozogamicinas, ozogamicinas de Gemtuzumab, Hidroxiureas, Idarubicinas, Ifosfamidas, mesilatos de Imatinib, Irinotecanos, Letrozoles, Leucovorinas, Levamisoles, Lomustinas, CCNUs, Mecloretaminas, mostazas de Nitrógeno, Megestroles, acetatos de Megestrol, Melfalanos, L-PAMs, Mercaptopurinas, 6-Mercaptopurinas, Mesnas, Metotrexatos, Metoxsalenos, Mitomicinas, Mitomicina C, Mitotanos, Mitoxantronas, Nandrolonas, Fenpropionatos de Nandrolona, Nofetumomabs, Oprelvequinas, Oxaliplatinas, Paclitaxeles, Pamidronatos, Pegademasas, Pentostatinas, Pipobromanos, Plicamicinas, Mitramicinas, Porfímeros, Porfímero de sodio, Procarbazinas, Quinacrinas, Rasburicasos, Rituximabs, Sargramostimos, Estreptozocinas, Talcos, Tamoxifenos, Temozolomidas, Tenipósidos, Testolactonas, Tioguaninas, 6-Tioguaninas, Trietilentiofosforamidos (Tiotepas), Topotecanos, Toremifenos, Trastuzumabs, Tretinoinas, Mostazas de Uracilo, Valrubicinas,

Vinblastinas, Vincristinas, Vinorelbinas, Zoledronatos, Acivicinas, Aclarubicinas, Acodazoles, Acroninas, Adozelesinas, Aldesleucinas, Ácidos Retinoicos, Alitretinoinas, Ácidos 9-Cis-Retinoicos, Alvocidibs, Ambazonas, Ambomicinas, Ametantronas, Aminoglutetimidas, Amsacrinas, Anaxironas, Ancitabinas, Antramicinas, Apazicuonas, Argimesnas, Asperlinas, Atrimustinas, Azacitidinas, Azetepas, Azotomicinas, Banoxantronas, Batabulinas, Batimastatos, Benaxibinas, Bendamustinas, Benzodepas, Bicalutamidas, Bietaserpinas, Biricodares, Bisantrenos, Dimesilatos de Bisnafida, Bizelesinas, Bortezomibs, Brequinares, Bropiriminas, Budotitanos, Cactinomicinas, Canertinibs, Caracemidas, Carbetímeros, Carboquonas, Carmofures, Carubicinas, Carzelesinas, Cedefingoles, Cemadotinas, Ciorambucilos, Cioteronelos, Cirolemicinas, Clanfenures, Clofarabinas, Crisnatoles, Decitabinas, Dexniguldipinas, Dexormaplatinas, Dezaguaninas, Diaziquonas, Dibroespidos, Dienogests, Dinalinas, Disermolidos, Dofequidares, Doxifluridinas, Droloxifenos, Duazomicinas, Ecomustinas, Edatrexatos, Edotecarinas, Eflomitinas, Elacridares, Elinafidas, Elsamitrucinas, Emitefurs, Enloplatinas, Enpromatos, Enzastaurinas, Epipropidinas, Eptaloprostos, Erbulozoles, Esorubicinas, Etanidazoles, Etoglucidos, Etoprinas, Exisulindos, Fadrozoles, Fazarabinas, Fenretinidas, Fluoximesteronas, Flurocitabinas, Fosquidonas, Fostriecinas, Fotretaminas, Galarubicinas, Galocitabinas, Geroquinoles, Gimatecanos, Gimeracilos, Gloxazonas, Glufosfamidas, Ilmofosinas, Ilomastatos, Imexonas, Improsulfanos, Indisulamos, Inproquonas, Interleucinas, Interleucinas-2, Interleucinas recombinantes, Intoplicinas, lobenguanos, Iproplatinos, Irsogladinas, Ixabepilonas, Cetotrexatos, L-Alanosinas, Lanreótidos, Lapatinibs, Ledoxantronas, Leuprolidos, Leuprorelinos, Lexacalcitoles, Liarozoles, Lobaplatinas, Lometrexoles, Lonafarnibs, Losoxantronas, Lurtotecanos, Mafosfamidas, Manosulfanos, Marimastatos, Masoprocolos, Maitansinas, Mecioretaminas, Melengestroles, Meifalanos, Menogarilos, Mepitiostanos, Metesindos, Metomidatos, Metoprinas, Meturedepas, Miboplatinas,

Miproxifenos, Misonidazoles, Mitindomidas, Mitocarcinas, Mitocrominas, Mitoflaxonas, Mitogilinas, Mitoguazonas, Mitomalcinas, Mitonafidas, Mitoquidonas, Mitospers, Mitozolomidas, Mivobulinas, Mizoribinas, Mofarotenos, Mopidamoles, Mubritinibs, Ácidos Micofenólicos, Nedaplatinas, Neizarabinas, Nemorubicinas, Nitracrinas, Nocodazoles, Nogalamicinas, Nolatrexedos, Nortopixantronas, Ormaplatinas, Ortataxeles, Oteracilos, Oxisuranos, Oxofenarsinas, Patubilonas, Peldesinas, Peliomicinas, Pelitrexoles, Pemetrexedos, Pentamustinas, Peplomicinas, Perfosfamidas, Perifosinas, Picoplatinas, Pinafidas, Piposulfanos, Pirfenidonas, Piroxantronas, Pixantronas, Plevitrexedos, Plomestanas, Porfiromicinas, Prednimustinas, Propamidinas, Prospidos, Pumitepas, Puromicinas, Pirazofurinas, Ranimustinas, Riboprinas, Ritrosulfanos, Rogletimidas, Roquinimexos, Rufocromomicinas, Sabarubicinas, Safingoles, Satraplatinas, Sebriplatinas, Semustinas, Simtrazenas, Sizofiranos, Sobuzoxanas, Sorafenibs, Esparfosatos, Ácidos Esparfósicos, Esparsomicinas, Espirogermanos, Espiromustinas, Espiroplatinas, Escualaminas, Estreptonigrinas, Estreptovaricinas, Sufosfamidas, Sulofenuros, Tacedinalinas, Talisomicinas, Talimustinas, Tariquidares, Tauromustinas, Tecogalanos, Tegafures, Teloxantronas, Temoporfinas, Teroxironas, Tiamiprinas, Tiamiprinas, Tiazofurinas, Tilomisoles, Tiloronas, Timcodares, Timonacicos, Tirapazaminas, Topixantronas, Trabectedinas, Ecteinascidina 743, Trestolonas, Triciribinas, Trilostanos, Trimetrexatos, Tetranitratos de Triplatina, Triptorelinas, Trofosfarnidas, Tubulozoles, Ubenimexs, Uredepas, Vaispodars, Vapreótidos, Verteporfinas, Vinbiastinas, Vindesinas, Vinepidinas, Vinfluninas, Vinformidas, Vinglicinatos, Vinleucinoles, Vinleurosinas, Vinrosidinas, Vintriptoles, Vinzolidinas, Vorozoles, Xantomicinas A, Guameciclinas, Zeniplatinas, Zilascorbs [2-H], Zinostatinas, Zorubicinas, Zosuquidares, Acetazolamidas, Aciclovires, Adipiodonas, Alatrofloxacinas, Alfentaniles, extractos Alergénicos, inhibidores de Alfa 1-proteinasa, Aiprostadils, Amicacinas,

Aminoácidos, ácidos Aminocaproicos, Aminofilinas, Amitriptilinas, Amobarbitales, Amrinonas, Analgésicos, vacunas Anti-poliomielíticas, sueros anti-rábicos, inmunoglobulinas anti-tétanos, vacunas de tétanos, Antitrombinas III, sueros de Antiveneno, Argatrobanos, Argininas, ácidos Ascórbicos, Atenololes, Atracuros, Atropinas, Aurotioglucosas, Azatioprinas, Aztreonamos, Bacitracinas, Baclofenos, Basiliximabs, ácidos Benzoicos, Benztropinas, Betametasonas, Biotinas, Bivalirudinas, antioxidantes de Botulismo, Bretilos, Bumetanidas, Bupivacainas, Buprenorfinas, Butorfanoles, Calcitoninas, Calcitrioles, Calcios, Capreomicinas, Carboprostos, Carnitinas, Cefaniandoles, Cefoperazonas, Cefotaximas, Cefoxitinas, Ceftizoximas, Cefuroximas, Cioranfenicoles, Cioroprocainas, Cioroquinas, Clorotiazidas, Ciorpromazinas, ácidos Condroitinsulfúricos, Coriogonadotropinas alfa, Cromos, Cidofovires, Cimetidinas, Ciprofloxacinas, Cisatracuros, Clonidinas, Codeinas, Colquicinas, Colistinas, Colágenos, triflutatos de Corticorelin ovina, Corticotrofinas, Cosintropinas, Cianocobalaminas, Ciclosporinas, Cisteínas, Dacliximabs, Dalfopristinas, Dalteparinas, Danaparoides, Dantrolenos, Deferoxaminas, Desmopresinas, Dexametasonas, Dexmedetomidinas, Dexpantenoles, Dextranos, dextranos de hierro, ácidos Diatrizoico, Diazepams, Diazóxidos, Diciclominas, Digibindes, Digoxinas, Dihidroergotaminas, Diltiazems, Difenhidraminas, Dipiridamoles, Dobutaminas, Dopaminas, Doxacuros, Doxaprams, Doxercalciferoles, Doxiciclinas, Droperidoles, Difilinas, ácidos Edéticos, Edrofonos, Enalaprilatos, Efedrinas, Epoprostenoles, Ergocalciferoles, Ergonovinas, Ertapenems, Eritromicinas, Esmololes, Estradioles, Estrogénicos, ácidos Etacrínicos, Etanolaminas, Etanoles, aceites Etiodizados, ácidos Etidrónicos, Etomidatos, Factores VIII, Famotidinas, Fenoldopams, Fentaniles, Flumazeniles, Fluoresceínas, Flufenazinas, ácidos Fólicos, Fomepizoles, Fomivirsenos, Fondaparinuxs, Foscarnets, Fosfenitoinas, Furosemidas, Gadoteridoles, Gadoversetamidas, Ganciclovires, Gentamicinas, Glucagones, Glucosas,

Glicinas, Glicopirrolatos, Gonadorelinas, coriónicos de Gonadotropina, polisacáridos de Haemophilus B, Hemins, Hierbas, Histaminas, Hidralazinas, Hidrocortisonas, Hidromorfonas, Hidroxocobalaminas, Hidroxizinas, Hiosciaminas, Ibutilidos, Imiglucerasas, carmines de índigo, Indometacinas, Yoduros, lopromidas, ácidos Iotalámicos, ácidos loxáglicos, loxilanos, Isoniazidas, Isoproterenoles, vacuna de encefalitis Japonesa, Kanamicinas, Cetaminas, Labetaloles, Lepirudinas, Levobupivacainas, Levotiroxinas, Lincomicinas, Liotironinas, hormonas Luteinizante, vacunas de enfermedad de Lyme, Mangafodipirs, Mantoles, vacunas de polisacáridos de Meningococo, Meperidinas, Mepivacainas, Mesoridazinas, Metaraminoles, Metadonas, Metocarbamoles, Metohexitales, Metildopatos, Metilergonovinas, Metoclopramidas, Metoprololes, Metronidazoles, Minociclinas, Mivacuros, ácido Morruicos, Moxifloxacinas, Muromonab-CD3s, mofetiles de Micofenolato, Nafcilinas, Nalbufinas, Nalmefenos, Naloxonas, Neostigminas, Niacinamidas, Nicardipinas, Nitroglicerinas, Nitroprusidos, Norepinefrinas, Orfenadrinas, Oxacilinas, Oximorfonas, Oxitetraciclinas, Oxitocinas, Pancuronos, Pantenoles, ácidos Pantoténicos, Papaverinas, Peg-interferón-alfa (por ejemplo interferón alfa 2a o 2b), Penicilinas G, Pentamidinas, Pentazocinas, Pentobarbitales, Perfiutrenos, Perfenazinas, Fenobarbitales, Fentolaminas, Fenilefrinas, Fenitoinas, Fisostigminas, Fitonadionas, Polimixina bs, Pralidoximas, Prilocainas, Procainamidas, Procainas, Prociorperazinas, Progesteronas, Propranololes, hidróxidos de Piridostigmina, Piridoxinas, Quinidinas, Quinupristinas, inmunoglobulinas de la rabia, vacunas de la rabia, Ranitidinas, Remifentanilas, Riboflavinas, Rifampinas, Ropivacainas, Samarios, Escopolaminas, Selenios, Sermorelinas, Sincalidos, Somatremos, Espectinomicinas, Estreptocinasas, Estreptomicinas, Succinilcolinas, Sufentanilos, Sulfametoxazoles, Tacrolimus, Terbutalinas, Teriparatidas, Testosteronas, antitoxinas de tétanos, Tetracainas, sulfatos de tetradecilo, Teofilinas, Tiaminas,

Tietilperazinas, Tiopentales, hormonas que estimulan la tiroide, Tinzaparinos, Tirofibanos, Tobramicinas, Tolazolinas, Tolbutamidas, Torsemidas, ácidos Tranexámicos, Treprostinilos, Trifluoperazinas, Trimetobenzamidas, Trimetoprimas, Trometaminas, Tuberculinas, vacunas de tifoidea, Urofolitropinas, Urocinasas, ácidos Vaiproicos, Vasopresinas, Vecuronios, Verapamilos, Voriconazoles, Warfarinas, vacunas de fiebre amarilla, Zidovudinas, Zincs, clorhidratos de Ziprasidona, Aclacinomicinas, Actinomicinas, Adriamicinas, Azaserinas, 6-Azauridinas, Carzinofilinas, Cromomicinas, Denopterinas, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucinas, Enocitabinas, Loxuridinas, Olivomicinas, Pirarubicinas, Piritreximas, Pteropterinas, Tagafurs, Tubercidinas, Alteplasas, Arcitumomabs, bevacizumabs, Toxina de Botulínica tipo A's, Toxina Botulínica Tipo B's, Capromab Pendetidos, Daclizumabs, Dornasa alfas, Drotrecogina alfas, Imciromab Pentetatos, y Yodos-131.

En particular, los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, Interferón beta, Interferones alfa-2a, Interferones alfa-1, Interferones alfa-n3, Interferón beta-1, Interferones beta-1a, Interferones gamma-1b, Peg-interferón alfa-2 y Peginterferones alfa-2s, insulina, un bisfosfato (por ejemplo Pamidronatos o Zoledronatos), Docetaxeles, Doxorubicinas, Doxorubicinas liposomales y bevacizumabs.

2. Uso para Remover Glicosaminoglicanasas en Exceso

Se proporcionan en la presente métodos para tratar afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano por administración de una composición que contiene un PH20 soluble, típicamente una hialuronidasa soluble ya sea sola o en combinación con o adición de otro tratamiento y/o agente. Las enfermedades y afecciones asociadas con hialuronano son enfermedades y afecciones en las cuales los niveles de hialuronano se elevan como causa, consecuencia o de otra manera observados en la enfermedad o afección, y pueden tratarse por administración de las

hialuronidasas de composición, tal como un PH20 soluble, ya sea solo o en combinación con o además de otro tratamiento y/o agente.

Típicamente, las afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano se asocian con expresión de hialuronano elevada en un tejido, célula, o fluido corporal (por ejemplo tejido de tumor o tejido asociado con el tumor, sangre, o espacio intersticial) comparada con un control, por ejemplo otro tejido, célula o fluido corporal. La expresión de hialuronano elevada puede elevarse comparada con un tejido, célula o fluido corporal normal, por ejemplo, un tejido, célula o fluido corporal que es análogo a la muestra que es probada, pero aislada de un sujeto diferente, tal como un sujeto que es normal (es decir no tiene una enfermedad o afección, o no tiene el tipo de enfermedad o afección que el sujeto se ha probado que tiene), por ejemplo, un sujeto que no tiene una enfermedad o afección asociada con hialuronano. La expresión de hialuronano elevada puede elevarse comparada con un tejido análogo de otro sujeto que tiene una enfermedad o afección similar, pero cuya enfermedad no es tan severa y/o no se asocia con hialuronano o expresa hialuronano relativamente menos y de esta manera se asocia con hialuronanoa un grado menor. Por ejemplo, el sujeto a tratarse puede ser un sujeto con un cáncer asociado con hialuronano, donde las cantidades HA en el tejido, célula o fluido están relativamente elevadas comparadas con un sujeto que tiene un cáncer menos severo, tal como un cáncer de etapa temprana, diferenciado u otro tipo de cáncer. En otro ejemplo, la célula, tejido o fluido contiene niveles elevados de hialuronano comparado con una muestra de control, tal como un fluido, tejido, extracto (por ejemplo extracto celular o nuclear), preparación de ácido nucleico o péptido, línea celular, biopsia, muestra estándar u otra muestra, con una cantidad conocida o cantidad relativa de HA, tal como una muestra, por ejemplo una línea celular de tumor, conocida para expresar niveles relativamente bajos de HA, tal como líneas celulares de tumor

ejemplares descritas en la presente que expresan niveles bajos de HA, por ejemplo, la línea celular HCT 116, la línea celular HT29, la línea celular NCI H460, la línea celular DU145, la línea celular Capan-1, y tumores de modelos de tumor generados usando tales líneas celulares.

En algunos casos, las afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano se asocian con presión de fluido intersticial incrementada, volumen vascular disminuido, y/o contenido de agua incrementado en un tejido, tal como un tumor. En un ejemplo, el tratamiento con las composiciones y compuestos proporcionados en la presente alivia uno o más de estos síntomas u otros síntomas asociados con la enfermedad o afección, por ejemplo, mejora la sobrevivencia o calidad de vida del sujeto con el paso del tiempo, o inhibe el crecimiento del tumor.

Las afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano ejemplares que pueden tratarse usando las enzimas, composiciones y métodos proporcionados, incluyen, pero no se limitan a, cánceres ricos en hialuronano, por ejemplo, tumores, incluyendo tumores sólidos tal como cánceres de etapa final, los cánceres metastáticos, cánceres no diferenciados, cáncer de ovario, carcinoma in situ (ISC), carcinoma de célula escamosa (SCC), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, cáncer de colon y otros cánceres.

También ejemplos de afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano son enfermedades que se asocian con presión elevada de fluido intersticial, tal como enfermedades asociadas con presión de disco, y edema, por ejemplo, edema provocado por transplante de órgano, apoplejía, trauma del cerebro u otra lesión. Las afecciones y enfermedades asociadas con hialuronano ejemplares incluyen enfermedades y afecciones asociadas con presión elevada de fluido intersticial, volumen vascular disminuido, y/o contenido de agua incrementado en un tejido, incluyendo cánceres, presión de disco y edema. En un ejemplo, el tratamiento de la afección, enfermedad o trastorno asociado con

hialuronano incluye alivio, reducción, u otro efecto benéfico en uno o más de presión de fluido intersticial incrementada (IFP), volumen vascular disminuido, y contenido de agua incrementado en un tejido.

Típicamente, la enfermedad o afección asociada con hialuronano está asociada con expresión HA incrementada, por ejemplo, en un tejido enfermo, por ejemplo, un tumor. En un ejemplo, HALOs (regiones de matriz pericelulares que son ricos en proteoglicanos, incluyendo hialuronano) se forma en un tejido del sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo. En otro ejemplo, la presencia de HALOs se detecta en un cultivo in vitro de células de un tejido del sujeto, por ejemplo, un tejido enfermo.

a. Uso en tratamiento de cáncer

La hialuronidasa tiene efectos anticarcinogénicos directos por degradación de ácido hialurónico en tumores. De esta manera, las hialuronidasas de PH20 soluble, tal como esPH20, pueden usarse para tratar tumores, en particular, tumores que son ricos en hialuronano. El cáncer rico en hialuronano puede ser un cáncer en el cual las células de cáncer producen HALOs, cánceres que tienen expresión elevada de hialuronano (como se determina por innmunotinción, por ejemplo tinción histológica de secciones del tumor), cánceres que tienen HAS2 elevado (Hialuronano sintasa 2), cánceres que no producen hialuronidasa (HYAL1) *in vitro*. Los cánceres ricos en hialuronano pueden identificarse por cualquier método para evaluar la expresión de hialuronano, y otros métodos conocidos para procesar por ensayo la expresión de proteína/mARN.

Se han identificado diversos cánceres ricos en hialuronano. En algunos casos, la expresión de hialuronano se correlaciona con prognosis pobre, por ejemplo, tasa de sobrevivencia disminuida y/o tasa de sobrevivencia libre de recurrencia, metástasis, angiogénesis, invasión celular de cáncer en otros tejidos/áreas, y otros indicadores

de prognosis pobre. Tal correlación se ha observado, por ejemplo, en tumores ricos en hialuronano incluyendo cáncer de ovario, SCC, ISC, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer pancreático (ver, por ejemplo, Maarit et al., *Cancer Research*, 60:150-155 (2000); Karvinen et al., *British Journal of Dermatology*, 148:86-94 (2003); Lipponen et al., *Eur. Journal of Cancer*, 849-856 (2001); Pirinen et al., *Int. J. Cancer*: 95: 12-17 (2001); Auvinen et al., *American Journal of Pathology*, 156(2):529-536 (2000); Ropponen et al., *Cancer Research*, 58: 342-347 (1998)). De esta manera, los cánceres ricos en hialuronano pueden tratarse por la administración de una hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, para tratar uno o más síntomas del cáncer. Los tumores ricos en hialuronano incluyen, pero no se limitan a, próstata, mama, colon, ovario, estómago, cabeza y cuello y otros tumores y cánceres.

Las hialuronidasas también pueden usarse para incrementar la sensibilidad de tumores que son resistentes a quimioterapia convencional. Por ejemplo, una hialuronidasa, tal como PH20 soluble, puede administrarse a un paciente que tiene un tumor asociado con un efecto HYAL1 en una cantidad efectiva para incrementar la difusión alrededor del sitio de tumor (por ejemplo, para facilitar la circulación y/o concentraciones de agentes quimioterapéuticos en y alrededor del sitio de tumor), inhibir la motilidad celular de tumor, tal como por degradación de ácido hialurónico, y/o para disminuir el umbral de apoptosis celular de tumor. Esto puede atraer las células de tumor a un estado de anoikis, que hace la célula de tumor más susceptible a la acción de de agentes quimioterapéuticos. La administración de una hialuronidasa puede inducir respuesta de tumores previamente resistentes a la quimioterapia del páncreas, estómago, colon, ovarios, y mama (Baumgartner et al. (1988) *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker et al. (1986) *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390).

De esta manera, además del tratamiento de un cáncer con un PH20 soluble solo, las composiciones y métodos proporcionados en la presente también pueden usarse para tratar cánceres asociados con hialuronano por administración de un PH20 soluble en combinación con, por ejemplo, simultáneamente o antes de, un agente quimioterapéutico u otro agente anti-cáncer o tratamiento. En este ejemplo, la hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, típicamente potencia la penetración de agentes quimioterapéuticos u otros agentes anti-cáncer en tumores sólidos, por ello trata la enfermedad.

Las composiciones que contienen PH20 soluble pueden inyectarse intratumoralmente con agentes anti-cáncer o intravenosamente para cánceres diseminados o duros para alcanzar los tumores. El agente anticáncer puede ser un quimioterapéutico, un anticuerpo, un péptido, o un vector de terapia del gen, virus o ADN. Adicionalmente, la hialuronidasa puede usarse para reclutar células de tumor en el grupo circulante para sensibilización en tumores previamente quimiorefractorios que tienen resistencia al fármaco múltiple adquirida (St Croix et al., (1998) *Cancer Lett* Septiembre 131(1): 35-44).

Los agentes anti-cáncer ejemplares que pueden administrarse después, coincidente con o antes de la administración de un PH20 soluble, tal como un esPH20, incluyen, pero no se limitan a Acivicinas; Aclarubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleucinas; Alemtuzumabs; Alitretinoinas (ácidos 9-Cis-Retinoicos); Alopurinoles; Altretaminas; Alvocidibs; Ambazonas; Ambomicinas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidas; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxironas; Ancitabinas; Antramicinas; Apaziquonas; Argimesnas; Trióxidos Arsénicos; Asparaginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastats; BCG Live; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas; Bexarotenas; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodars; Bisantrenos; Bisantrenos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomibs;

Brequinars; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinibs; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetimeros; Carboplatinas; Carboquonas; Carmofurs; Carmustinas con Polifeprosanos; Carmustinas; Carubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Celecoxibs; Cemadotinas; Clorambucilos; Cioteronelos; Cirolemicinas; Cisplatinas; Cladribinas; Clanfenurs; Clofarabinas; Crisnatoles; Ciclofosfamidas; liposomales de Citarabina; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Darbepoyetinas Alfa; liposomales de Daunorubicina; Daunorubicinas/Daunomicinas; Daunorubicinas; Decitabinas; Diftitoxes de Denileucina; Dexniguldipinas; Dexonaplatinas; Dexrazoxanos; Dezaguaninas; Diaziquonas; Dibrospidios; Dienogests; Dinalinas; Disermolidos; Docetaxeles; Dofequidares; Doxifluridinas; liposomales de Doxorubicina; HCL de Doxorubicina; inyeccion de liposoma de HCL de Docorubicina; Doxorubicinas; Droloxifenos; Propionatos de Dromostanolona; Duazomicinas; Ecomustinas; Edatrexatos; Edotecarinas; Eflornitinas; Elacridares; Elinafidos; solución B de Elliott; Elsamitrucinas; Emitefuros; Enloplatinas; Enpromatos; Enzastaurinas; Epipropidinas; Epirubicinas; Epoyetinas alfa; Eptaloprostos; Erbulozoles; Esorubicinas; Estramustinas; Etanidazoles; Etoglucidos; fosfatos de Etopósido; Etopósidos VP-16; Etopósidos; Etoprinas; Exemestanos; Exisulinds; Fadrozoles; Fazarabinas; Fenretinidas; Filgrastims; Floxuridinas; Fludarabinas; Fluorouracilos; 5-fluorouracilos; Fluoximesteronas; Flurocitabinas; Fosquidonas; Fostriecinas; Fostriecinas; Fotretaminas; Fulvestrantes; Galarubicinas; Galocitabinas; Gemcitabinas; Gemtuzumabs/Ozogamicinas; Geroquinoles; Gimatecanos; Gimeracilos; Gloxazonas; Glufosfamidas; acetatos de Goserelina; Hidroxiureas; Ibritumomabs/Tiuxetanos; Idarubicinas; Ifosfamidas; Ilmofosinas; Ilomastatos; metilatos de Imatinib; Imexonas; Improsulfanos; Indisulams; Inproquonas; Interferones alfa-2a; Interferones alfa-2b; Interferones alfa; Interferones beta; Interferones gamma; Interferones; Interleucinas-2 y otras Interleucinas

(incluyendo Interleucinas recombinantes); Intoplicinas; Iobenguanos [131-I]; Iproplatinas; Irinotecanos; Irsogladinas; Ixabepilonas; Ketotrexatos; L-Alanosinas; Lanreotidos; Lapatinibs; Ledoxantronas; Letrozoles; Leucovorinas; Leuprolidos; Leuprorelinas (Leuprorelidos); Levamisoles; Lexacalcitoles; Liarozoles; Lobaplatinas; Lometrexoles; Lomustinas/CCNUs; Lomustinas; Lonafarnibs; Losoxantronas; Lurtotecanos; Mafosfamidas; Manosulfanos; Marimastats; Masoprocolos; Maitansinas; Mecloretaminas; Mecloretaminas/mostazas de nitrógeno; acetatos de Megestrol; Megestroles; Melengestroles; Melfalanos; Melfalans1L-PAMs; Menogarilos; Mepitiostanos; Mercaptopurinas; 6-Mecaptopurina; Mesnas; Metesinds; Metotrexatos; Metoxsalenos; Metomidatos; Metoprinas; Meturedepas; Miboplatinas; Miproxifenos; Misonidazoles; Mitindomidas; Mitocarcinas; Mitocrominas; Mitoflaxonas; Mitogilinas; Mitoguazonas; Mitomalcinas; Mitomicinas C; Mitomicinas; Mitonafidos; Mitoquidonas; Mitosperos; Mitotanos; Mitoxantronas; Mitozolomidas; Mivobulinas; Mizoribinas; Mofarotenos; Mopidamoles; Mubritinibs; Ácidos Micofenólicos; Fenpropionatos de Nandrolona; Nedaplatinas; Nelzarabinas; Nemorubicinas; Nitracrinas; Nocodazoles; Nofetumomabs; Nogalamicinas; Nolatrexeds; Nortopixantronas; Octreotidos; Oprelvequinas; Ormaplatinas; Ortataxeles; Oteracilos; Oxaliplatinas; Oxisuranos; Oxofenarsinas; Paclitaxeles; Pamidronatos; Patubilonas; Pegademasos; Pegaspargasos; Pegfilgrastimas; Peldesinas; Peliomicinas; Pelitrexoles; Pemetrexeds; Pentamustinas; Pentostatinas; Peplomicinas; Perfosfamidas; Perifosinas; Picoplatinas; Pinafidas; Pipobromanos; Piposulfanos; Pirfenidonas; Piroxantronas; Pixantronas; Plevitrexeds; Mitramicinas de Plicamicid; Plicamicinas; Plomestanos; Plomestanos; Porfímeros sodio; Porfímeros; Porfiromicinas; Prednimustinas; Procarbazinas; Propamidinas; Prospidios; Pumitepas; Puromicinas; Pirazofurinas; Quinacrinas; Ranimustinas; Rasburicasos; Riboprinas; Ritrosulfanos; Rituximabs; Rogletimidas; Roquinimexs; Rufocromomicinas; Sabarubicinas; Safingoles; Sargramostimos; Satraplatinas;

Sebriplatinas; Semustinas; Simtrazenos; Sizofiranos; Sobuzoxanos; Sorafenibs; Sparfosatos; Ácidos Esparfósicos; Esparsomicinas; Espirogermanios; Espiromustinas; Espiroplatinas; Espiroplatinas; Escualaminas; Estreptonigrinas; Estreptovaricinas; Estreptozocinas; Sufosfamidas; Sulofenures; Malato de Sunitinib; 6-TG; Tacedinalinas; Talcos; Talisomicinas; Talimustinas; Tamoxifenos; Tariquidares; Tauromustinas; Tecogalanos; Tegafures; Teloxantronas; Temoporfinas; Temozolomidas; Tenipósidos/VM-26s; Tenipósidos; Teroxironas; Testolactonas; Tiamiprinas; Tioguaninas; Tiotepas; Tiamiprinas; Tiazofurinas; Tilomisoles; Tiloronas; Timcodars; Timonacicos; Tirapazaminas; Topixantronas; Topotecanos; Toremifenos; Tositumomabs; Trabectedinas (Ecteinascidina 743); Trastuzumabs; Trestolonas; Tretinoinas/ATRA; Triciribinas; Trilostanos; Trimetrexatos; Tetranitratos de Triplatina; Triptorelinas; Trofosfamidas; Tubulozoles; Ubenimexs; Mostazas de Uracilo; Uredepas; Valrubicinas; Valspodares; Vapreotidos; Verteporfinas; Vinblastinas; Vincristinas; Vindesinas; Vinepidinas; Vinfluninas; Vinformidas; Vinglicinatos; Vinleucinoles; Vinleurosinas; Vinorelbinas; Vinrosidinas; Vintriptoles; Vinzolidinas; Vorozoles; Xantomicinas A (Guameciclinas); Zeniplatinas; Zilascorbs [2-H]; Zinostatinas; Zoledronato; Zorubicinas; Y Zosuquidars, por ejemplo:

Aldesleucinas (por ejemplo PROLEUKIN®); Alemtuzumabs (por ejemplo CAMPATH®); Alitretinoinas (por ejemplo PANRETIN®); Alopurinoles (por ejemplo ZYLOPRIM®); Altretaminas (por ejemplo HEXALEN®); Amifostinas (por ejemplo ETHYOL®); Anastrozoles (por ejemplo ARIMIDEX®); Trióxidos Arsénicos (por ejemplo TRISENOX®); Asparaginasas (por ejemplo ELSPAR®); BCG Live (por ejemplo TICE® BCG); Bexarotenos (por ejemplo TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®); Bleomicinas (por ejemplo BLENOXANE®); Busulfán intravenoso (por ejemplo BUSULFEX®); orales de Busulfan (por ejemplo MYLERAN™); Calusteronas (por ejemplo METHOSARB®); Capecitabinas (por ejemplo XELODA®); Carboplatinas (por ejemplo PARAPLATIN®); Carmustinas (por ejemplo BCNU®, BiCNU®); Carmustinas con Polifeprosanos (por

ejemplo obleas GLIADEL®); Celecoxibs (por ejemplo CELEBREX®); Clorambucilos (por ejemplo LEUKERAN®); Cisplatinas (por ejemplo PLATINOL®); Cladribinas (por ejemplo LEUSTATIN®, 2-CdA®); Ciclofosfamidas (por ejemplo CYTOXAN®, NEOSAR®); Citarabinas (por ejemplo CYTOSAR-U®); liposomales de Citarabina (por ejemplo DepoCyt®); Dacarbazinas (por ejemplo DTIC-Domeu): Dactinomicinas (por ejemplo COSMEGEN®); Darbepoyetinas Alfa (por ejemplo ARANESP®); liposomales de Daunorubicina (por ejemplo DANUOXOME®); Daunorubicinas/Daunomicinas (por ejemplo CERUBIDINE®); Diftitoxos de Denileucina (por ejemplo ONTAK®); Dexrazoxanos (por ejemplo ZINECARD®); Docetaxeles (por ejemplo TAXOTERE®); Doxorubicinas (por ejemplo ADRIAMYCIN®, RUBEX®); liposomales de Doxorubicina, incluyendo inyecciones de liposoma de HCL de Docorubicina (por ejemplo DOXIL®); propionatos de Dromostanolona (por ejemplo Inyección DROMOSTANOLONE® y MASTERONE®); Soluciones B de Elliott (por ejemplo Elliott's B Solution®); Epirubicinas (por ejemplo ELLENCE®); Epoyetinas alfa (por ejemplo EPOGEN®); Estramustinas (por ejemplo EMCYT®); fosfatos de Etopósido (por ejemplo ETOPOPHOS®); Etopósidos VP-16 (por ejemplo VEPESID®); Exemestanos (por ejemplo AROMASIN®); Filgrastimas (por ejemplo NEUPOGEN®); Floxuridinas (por ejemplo FUDR®); Fludarabinas (por ejemplo FLUDARA®); Fluorouracilos incl. 5-FUs (por ejemplo ADRUCIL®); Fulvestrantes (por ejemplo FASLODEX®); Gemcitabinas (por ejemplo GEMZAR®); Gemtuzumabs/Ozogamicinas (por ejemplo MYLOTARG®); acetatos de Goserelina (por ejemplo ZOLADEX®); Hidroxiureas (por ejemplo HYDREA®); Ibritumomabs/Tiuxetanos (por ejemplo ZEVALIN®); Idarubicinas (por ejemplo IDAMYCIN®); Ifosfamidas (por ejemplo IFEX®); mesilatos de Imatinib (por ejemplo GLEEVEC®); Interferones alfa-2a (por ejemplo ROFERON-A®); Interferones alfa-2b (por ejemplo INTRON A®); Irinotecanos (por ejemplo CAMPTOSAR®); Letrozoles (por ejemplo FEMARA®); Leucovorinas (por ejemplo WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); Levamisoles (por ejemplo ERGAMISOL®); Lomustinas/CCNUs (por ejemplo CeeBU®);

150

Mecloretaminas/mostazas de nitrógeno (por ejemplo MUSTARGEN®); acetatos de Megestrol (por ejemplo MEGACE®); Melfalanos/L-PAMs (por ejemplo ALKERAN®); Mercaptopurina incl. 6-MPs (por ejemplo PURINETHOL®); Mesnas (por ejemplo MESNEX®); Metotrexatos; Metoxsalenos (por ejemplo UVADEX®); Mitomicinas C (por ejemplo MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Mitotanos (por ejemplo LYSODREN®); Mitoxantronas (por ejemplo NOVANTRONE®); Fenpropionatos de Nandrolona (por ejemplo DURABOLIN-50®); Nofetumomabs (por ejemplo VERLUMA®); Oprelvequinas (por ejemplo NEUMEGA®); Oxaliplatinas (por ejemplo ELOXATIN®); Paclitaxeles (por ejemplo PAXENE®, TAXOL®); Pamidronatos (por ejemplo AREDIA®); Pegademasas (por ejemplo ADAGEN®); Pegaspargasas (por ejemplo ONCASPAR®); Pegfilgrastimos (por ejemplo NEULASTA®); Pentostatinas (por ejemplo NIPENT®); Pipobromanos (por ejemplo VERCYTE®); Plicamicina/Mitramicinas (por ejemplo MITHRACIN®); Porfímeros sodio (por ejemplo PHOTOFRIN®); Procarbazinas (por ejemplo MATULANE®); Quinacrinas (por ejemplo ATABRINE®); Rasburicasas (por ejemplo ELITEK®); Rituximabs (por ejemplo RITUXAN®); Sargramostimas (por ejemplo PROKINE®); Estreptozocinas (por ejemplo ZANOSAR®); Malatos de Sunitinib (por ejemplo SUTENT®); Talcos (por ejemplo SCLEROSOL®); Tamoxifenos (por ejemplo NOLVADEX®); Temozolomidas (por ejemplo TEMODAR®); Tenipósidos/VM-26s (por ejemplo VUMON®); Testolactonas (por ejemplo TESLAC®); Tioguaninas incl. 6-TG; Tiotepas (por ejemplo THIOPLEX®); Topotecanos (por ejemplo HYCAMTIN®); Toremifenos (por ejemplo FARESTON®); Tositumomabs (por ejemplo BEXXAR®); Trastuzumabs (por ejemplo HERCEPTIN®); Tretinoines/ATRA (por ejemplo VESANOID®); Mostazas de Uracilo; Valrubicinas (por ejemplo VALSTAR®); Vinblastinas (por ejemplo VELBAN®); Vincristinas (por ejemplo ONCOVIN®); Vinorelbinas (por ejemplo NAVELBINE®); y Zoledronatos (por ejemplo ZOMETA®).

En un ejemplo, un PH20 soluble, tal como un esPH20, por ejemplo, rHuPH20 PEGilado, se administra a un sujeto después de, coincidente con

o antes de la administración de uno o más de docetaxel (por ejemplo TAXOTERE®), liposomal de Doxorubicina (por ejemplo DOXIL®), Malato de Sunitinib (por ejemplo SUTENT®) o Bevacizumab (AVASTIN®).

Por lo tanto, los polipéptidos PH20 solubles proporcionados en la presente pueden usarse en el tratamiento de cánceres metastáticos y no metastáticos, incluyendo aquellos que tienen actividad de hialuronidasa endógena disminuida relativa a células no cancerosas. Las hialuronidasas pueden usarse como un agente quimioterapéutico solo o en combinación con otros quimioterapéuticos. Los cánceres ejemplares incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de célula de pulmón pequeña, carcinoma de célula de pulmón escamosa, y cánceres de la mama, ovarios, cabeza y cuello, o cualquier otro cáncer asociado con niveles bajos de actividad de hialuronidasa o catabolismo de ácido hialurónico disminuido.

b. Uso en el tratamiento de acumulación de glicosaminoglicano en el cerebro

Los niveles de ácido hialurónico se elevan en un número de afecciones patológicas cerebroespinales. Los niveles de ácido hialurónico cerebroespinal son normalmente menores que 200 µg/L en adultos (Laurent et al. (1996) *Acta Neurol Scand September* 94(3):194-206), pero pueden elevarse a niveles de sobre 8000 µg/L en enfermedades tal como meningitis, estenosis espinal, lesión de cabeza e infarto cerebral. Las hialuronidasas, tal como, por ejemplo, rHuPH20 soluble, pueden utilizarse para degradar niveles críticamente elevados de sustrato.

La carencia de linfáticos efectivos en el cerebro también puede llevar a edema que amenaza con la vida después del trauma de cabeza. La acumulación de ácido hialurónico es un resultado de síntesis incrementada por sintasas de ácido hialurónico y degradación disminuida. La acumulación de ácido hialurónico puede inicialmente

servir el propósito benéfico de incrementar el contenido de agua en el tejido dañado para facilitar la extravasación de leucocito, pero la acumulación continua puede ser letal. La administración de hialuronidasa, tal como intratecalmente o intravenosamente, a un paciente que padece de trauma en la cabeza puede servir para remover la acumulación de ácido hialurónico en el tejido y el agua asociada con esto.

El PH20 soluble también puede usarse en el tratamiento de edema asociado con tumores en el cerebro, particularmente que se asocian con multiforma de glioblastoma. El edema asociado con tumores del cerebro resulta de la acumulación de ácido hialurónico en las porciones no cancerosas del cerebro adyacente al tumor. La administración de una hialuronidasa PH20 soluble a los sitios de acumulación de ácido hialurónico (por ejemplo, por inyección intravenosa o por medio de una desviación) puede calmar el edema asociado con tales malignidades al degradar el exceso de ácido hialurónico en estos sitios.

c. Uso en el tratamiento de la acumulación de glicosaminoglicano en enfermedad cardiovascular

Las hialuronidasas de PH20 soluble pueden usarse en el tratamiento de alguna enfermedad cardiovascular. La administración de hialuronidasa en modelos animales después del infarto al miocardio experimental puede reducir el tamaño del infarto (Maclean, et al (1976) Science 194(4261):199-200). Un mecanismo propuesto por el cual esto puede ocurrir es al reducir la acumulación de ácido hialurónico que ocurre después de la reperfusión por isquemia. La reducción del tamaño de infarto se cree que se presenta del drenaje linfático incrementado y oxigenación del tejido incrementado y reducción del contenido de agua al miocardio.

Las hialuronidasas de PH20 soluble también pueden usarse para limitar las placas coronarias de arteriosclerosis. Tales placas

acumulan los glicosaminoglicanos y median el macrófago y la adhesión celular de espuma (Kolodgie et al. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(10):1642-8).

d. Uso en vitrectomía y trastornos y afecciones oftálmicas

La hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, puede usarse para minimizar el desprendimiento o desgarre de la retina durante la vitrectomía. Esto puede provocar, por ejemplo, el cuerpo vítreo para volverse no acoplado o "desinsertado" de la retina, antes de la eliminación del cuerpo vítreo. Tal desinserción o no acoplamiento del cuerpo vítreo puede minimizar la posibilidad de que el desgarre o desprendimiento adicional de la retina ocurrirá ya que el cuerpo vítreo se remueve.

La hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, puede usarse para varias aplicaciones oftálmicas, incluyendo la aplicación adjunta de vitrectomía descrita en la Pat. De E.U.A. No. 5,292,509. El uso de una hialuronidasa altamente purificada, tal como, por ejemplo, PH20 soluble proporcionado en la presente, es preferible para procedimientos intraoculares para minimizar la inmunogenicidad y toxicidad.

Las hialuronidasas de PH20 soluble pueden usarse para tratar y/o prevenir trastornos oftálmicos al, por ejemplo, prevenir la neovascularización e incrementar la tasa de aclaramiento del vítreo de los materiales tóxicos a la retina. Una hialuronidasa de PH20 soluble puede administrarse en una cantidad efectiva para licuar el humor vítreo del ojo sin provocar daño tóxico al ojo. La licuefacción del humor vítreo incrementa la tasa de intercambio líquido de la cámara vítrea. Este incremento en intercambio remueve los materiales contaminantes cuya presencia puede provocar daño a la retina y oftalmológicos.

Las hialuronidasas de PH20 soluble también pueden usarse para reducir la presión postoperativa. El ácido hialurónico se ha usado en

el ojo principalmente como un espaciador durante los procedimientos quirúrgicos de catarata y lentes intraoculares. También se usa en otros procedimientos quirúrgicos oculares tal como cirugía de glaucoma, vítrea y retina y en transplante de cornea. Un efecto colateral común que ocurre en pacientes con cataratas postoperativas es uno importante temprano, y ocasionalmente prolongado, elevado en presión intraocular. Tal afección es algunas veces seria, especialmente en paciente con cambios en el disco óptico glaucomatoso. La hialuronidasa, tal como PH20 soluble, puede co-administrarse con ácido hialurónico al ojo antes de la cirugía para reducir la presión postoperativa en el ojo. La hialuronidasa se administra en una cantidad efectiva para reducir la presión intraocular a niveles pre-operativos al romper el ácido hialurónico sin disminuir su efectividad durante la cirugía ni provocar efectos colaterales en el paciente (Patente de E.U.A. No. 6,745,776).

Las hialuronidasas de PH20 soluble también pueden administrarse a pacientes con glaucoma para remover glicosaminoglicanos de la malla trabecular y reducir la presión intraocular, y puede aplicarse al vítreo para promover la resolución de hemorragias vítreas (es decir extravasación de sangre en el vítreo), que puede ocurrir en conexión con las afecciones tal como retinopatía diabética, neovascularización de la retina, oclusión de vena de la retina, desprendimiento vítreo posterior, lágrimas de la retina, traumas oculares y similares. La presencia de hemorragias vítreas, que típicamente se disminuyen para resolver, pueden retardar, complicar o prevenir procedimientos que requiere la retina para visualizarse a través del vítreo para diagnóstico y/o para procedimientos de tratamiento tal como fotocoagulación láser y similares que a menudo son tratamientos primarios para afecciones tales como retinopatía diabética proliferativa.

e. Uso en hipodermoclisis

La hipodermoclisis, la infusión de fluidos y electrolitos en la hipodermis de la piel, es una técnica de hidratación útil y sencilla adecuada para paciente adultos suavemente hasta moderadamente deshidratados, especialmente los ancianos. Aunque se considera seguro y efectivo, el efecto adverso más frecuente es edema subcutáneo suave que puede tratarse por masaje local o diuréticos sistémicos. Aproximadamente 3 L pueden darse en un periodo de 24 horas en dos sitios separados. Los sitios de infusión comunes incluyen el pecho, abdomen, muslos y extremidades superiores. Las soluciones usadas en hipodermoclisis incluyen, por ejemplo, solución salina normal, solución salina medio normal, glucosa con solución salina y glucosa al 5%. El cloruro de potasio también puede agregarse a la solución. La adición de una hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, a la solución puede potenciar la absorción de fluido e incrementar la tasa general de administración.

f. Uso en terapia génica

La eficacia de la mayoría de los vehículos de suministro de gen *in vivo* no corresponden a la eficacia encontrada observada *in vitro*. Los glicosaminoglicanos pueden dificultar la transferencia y difusión de ADN y vectores víricos en muchos tipos celulares. Los niveles de tal material de matriz extracelular puede dificultar considerablemente el proceso. La administración de hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, puede abrir los canales en la matriz extracelular, de esta manera potencia el suministro de la terapia génica. Por ejemplo, el PH20 soluble puede administrarse con colagenasa para facilitar la transducción de ADN *in vivo* (Dubensky et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81(23):7529-33). La hialuronidasa también puede potenciar la terapia del gen usando virus asociado con adeno (Favre et al, (2000) *Gene Therapy* 7(16):1417-20). Los canales abiertos después de la administración de hialuronidasa son de un tamaño que típicamente

potencia la difusión de moléculas más pequeñas tal como retrovirus, adenovirus, virus asociados con adeno y complejos de ADN (así como otros agentes terapéuticos y farmacológicos de interés). Los poros no son tan grandes, sin embargo, como para promover la dislocación y movimiento de las células.

En algunos ejemplos, los virus pueden prepararse por ingeniería para expresar hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, para facilitar su replicación y velocidad dentro de un tejido objetivo. El tejido objetivo puede ser, por ejemplo, un tejido canceroso por ello el virus es capaz de replicación selectiva dentro del tumor. El virus también puede ser un virus no lítico en donde el virus selectivamente se replica bajo un promotor específico de tejido. Como el replicado de virus, la co-expresión de hialuronidasa con genes víricos puede facilitar la velocidad del virus *in vivo*.

g. Usos cosméticos

Las hialuronidasas, tal como un PH20 soluble, pueden ser administradas para remover glicosaminoglicanos involucrados en la acumulación de celulitis y para promover el flujo linfático. Por ejemplo, el PH20 soluble puede usarse para el tratamiento de celulitis. La hialuronidasa puede administrarse a través de inyecciones subcutáneas repetidas, a través de suministro transdérmico en la forma de ungüentos o cremas o a través del uso de formulaciones de liberación lenta inyectables para promover la degradación continúa de glicosaminoglicanos y prevenir su regreso.

La hialuronidasa, tal como un PH20 soluble, también puede usarse para tratar afecciones tal como edema de "piel arrugada" o edema de "piel de naranja". Las hialuronidasas pueden efectuar despolimerización de las cadenas de mucopolisacárido largas que pueden acumularse en la dermis y que son responsables de la retención de agua ligada y de la disminución, por compresión

capilar, de la difusión de líquidos orgánicos, que eliminan desechos metabólicos. Tal retención de agua y desechos asociados con sobrecarga de grasa de los lipocitos, constituye edema de "piel arrugada" clásico o edema de "piel de naranja". La despolimerización puede cortar las cadenas largas de mucopolisacáridos en cadenas más cortas, resultando en la eliminación del agua ligada y desechos y restauración de la circulación venosa y linfática, culminando en la desaparición del edema local.

h. Uso en transplante de órganos

El contenido de ácido hialurónico en un órgano puede incrementarse con la inflamación. Una concentración incrementada de ácido hialurónico se ha observado en el tejido de órganos diferentes caracterizado por lesión inflamatoria-inmunológica tal como alveolitis (Nettelbladt et al. (1991) *Am. Rev. Resp. Dis.* 139: 759-762) e infarto al miocardio (Waldenstrom et al. (1991) *J. Clin. Invest.* 88(5): 1622-1628). Otros ejemplos incluyen rechazo de aloinjerto después de un transplante renal (Hallgren et al. (1990) *J. Exp. Med.* 171: 2063-2076; Wells et al. (1990) *Transplantation* 50: 240-243), intestino delgado (Wallander et al. (1993) *Transplant. Int.* 6: 133-137) o cardiaco (Hallgren et al. (1990) *J Clin Invest* 85:668-673); o un infarto al miocardio de origen vírico (Waldenstrom et al. (1993) *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 277-282). La ocurrencia de edemas intersticiales en conexión con el injerto de un órgano constituye un problema severo en el campo de la cirugía de transplantes. Los injertos con edemas intersticiales pueden hincharse a tal grado que la función está temporalmente perdida. En algunos casos, la hinchazón puede provocar interrupción del riñón, resultando en una hemorragia masiva. Las hialuronidasas, tal como un PH20 soluble, pueden usarse para degrada los glicosaminoglicanos acumulados en un transplante de órgano. La eliminación de tales glicosaminoglicanos promueve la eliminación de

agua del injerto y de esta manera potencia la función del órgano.

i. Uso en enfermedad pulmonar

Los niveles de ácido hialurónico en lavados bronqueoalveolares (BAL) de individuos normales están generalmente debajo de 15 ng/ml. Los niveles de ácido hialurónico en BAL se elevan dramáticamente en condiciones de distensión respiratoria (Bjermer et al.(1987) *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6602):803-6). El ácido hialurónico incrementado en el pulmón puede prevenir la difusión de oxígeno e intercambio de gas así como activar el neutrófilo y respuestas de macrófago. Las preparaciones purificadas de PH20 soluble, tal como cualquiera proporcionada en la presente, pueden suministrarse por ya sea suministro pulmonar o intravenoso a pacientes que se presentan con tales afecciones para reducir los niveles de hialuronano. Las hialuronidasas, tal como un PH20 soluble, también pueden administrarse a pacientes que padecen de otras complicaciones pulmonares que se asocian con glicosaminoglicanos elevados o para potenciar el suministro de otras moléculas cosuministradas al pulmón.

3. Otros usos

En ejemplos adicionales de su uso terapéutico, la hialuronidasa, tal como un PH20 soluble incluyendo esPH20 proporcionada en la presente, puede usarse para tales propósitos como un antídoto a necrosis local de inyección paravenosa de sustancias necróticas tal como vinca alcaloides (Few et al. (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26), tratamiento de quistes de ganglios (Paul et al. (1997) *J Hand Surg.* 22 (2): 219-21) y tratamiento de necrosis del tejido debido a insuficiencia venosa (Elder et al. (1980) *Lancet* 648-649). El PH20 soluble también puede usarse para tratar quistes de ganglios (también conocido como un quiste de muñeca, quiste de la Biblia, o quiste del tendón dorsal), que están en la masa del tejido suave más común de la

mano y son sacos rellenos de fluido que pueden sentirse debajo de la piel.

Las hialuronidasas, tal como PH20 soluble, pueden usarse en el tratamiento de la lesión de la médula espinal al degradar los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs). Después de la lesión de médula espinal, las cicatrices gliales que contienen CSPGs se producen por astrocitos. Los CSPGs juegan un papel decisivo en la inhibición del crecimiento de axón. Además, la expresión de CSPG se ha mostrado para incrementar la lesión siguiente del sistema nervioso central (CNS). El PH20 soluble también puede utilizarse para el tratamiento de discos herniados en un proceso conocido como quimionucleolisis. La condroitinasa ABC, una enzima que escinde los sustratos similares como hialuronidasa, puede inducir la reducción de presión intradiscal en la espina lumbar. Existen tres tipos de lesiones de disco. Un disco prominente es uno que está intacto pero protuberante. En un disco extrudido, la envoltura fibrosa se ha desgarrado y el NP ha salido, pero todavía se conecta al disco. En un disco secuestrado, un fragmento del NP se ha desatado del disco y está libre en el canal espinal. La quimionucleolisis es típicamente efectiva en discos prominentes y extruidos, pero no en lesiones de disco secuestrado.

I. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen sólo para propósitos ilustrativos y no se pretenden para limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Generación de Mutantes de Eliminación de terminal Carboxi de Hialuronidasa PH20 Humana

En este ejemplo, se generaron una serie de mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana. La

hialuronidasa PH20 humana madura, o molécula de adhesión de esperma 1 (SPAM1), contiene 474 aminoácidos mientras que los mutantes de eliminación de terminal carboxi maduros generados en este ejemplo están en el intervalo de longitud desde 472 aminoácidos hasta 415 aminoácidos.

Los oligonucleótidos de ADN que codifican los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana truncados de aminoácido A507 hasta aminoácido K450 se sintetizaron de acuerdo a protocolos de síntesis de ADN estándar. La secuencia de ADN precursora fue una hialuronidasa PH20 humana optimizada de codón, la secuencia de nucleótido de la cual se establece en la SEQ ID NO: 2. Esta hialuronidasa PH20 humana optimizada de codón contiene una secuencia de señal kappa de inmunoglobulina heteróloga (IgK), establecida en la SEQ ID NO: 144. Adicionalmente, las secuencias contienen un sitio de restricción 5' NheI y un 3' BamHI para permitir la clonación en el plásmido HZ24 (SEQ ID NO:140). Las secuencias de nucleótido del mutante de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH20 humana se establecen en las SEQ ID NOS: 146-185 y 199-201. Las secuencias de ADN sintéticas se digirieron con enzimas de restricción NheI y BamHI y clonaron en un plásmido HZ24 similarmente digerido para generar un plásmido SPAM1-HZ24 mutante para cada clon individual.

Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana se establecen en la Tabla 3. Los mutantes SPAM1 se identifican por los 4 aminoácidos en el extremo de terminal C de las proteínas. También establecen la longitud, en aminoácidos, del precursor y mutantes de eliminación de terminal carboxi maduros.

Tabla 3. Mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH20 humana.

Mutante	Precursor (aminoácidos)	Precursor SEQ ID NO	(Aminoácidos) maduros	SEQ ID NO maduro
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-FLII	503	5	468	57
SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69
SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71
SPAM1-EPQI	480	20	445	72
SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76
SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83

SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-DGVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

Ejemplo 2

Expresión de Mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana generados en el Ejemplo 1 se expresaron en CHO-S células. Adicionalmente, rHuPH20 y PH20 etiquetado His se expresaron en cada una de cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina, incluyendo Lec1 (Cat No. CRL-1735, ATCC), Lec2 (Cat No. CRL-1736, ATCC), Lec8 (Cat No. CRL-1737, ATCC) y Pro-5 (Cat No. CRL-1781). La expresión de PH20 en células mutantes Lec se discute además en el Ejemplo 9 a continuación.

A. Expresión Transitoria en Células CHO-S en Placas de 6 Pozos

Los plásmidos PH20-HZ24 mutantes generados en el Ejemplo 1 se infectaron transitoriamente en células CHO-S (derivadas de células K1 de Ovario de Hámster Chino CHO) usando GeneJuice® (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En corto, las células CHO-S se hicieron crecer en Medio CD CHO complementado con L-glutamina. Antes de la transfección, las células CHO-S se colocaron en placas de 6 pozos, con aproximadamente $5x10^5$ células por pozo, e hicieron crecer durante la noche a 37°C con CO_2 al 5%. El medio luego se removió y las células CHO-S se lavaron 2 veces con 1 mL de medio libre de suero. El GeneJuice® se

mezcló con medio libre de suero seguido por la adición de 2 µg de ADN mutante-HZ24. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5-15 minutos, la mezcla de GeneJuice®/ADN se agregó gota a gota a un pozo individual que contiene las células CHO-S lavadas. Después de 4 horas, el medio se reemplazó con 1 mL de medio CD-CHO complementado con L-glutamina y las células se incubaron durante 72 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Después de la expresión, el medio y las células se cosecharon separadamente.

B. Expresión transitoria en Células CHO en placas de cultivo celular de 10 cm

Los plásmidos PH20-HZ24 mutantes generados en el Ejemplo 1 se infectaron transitoriamente en células CHO-S usando GeneJuice® (Novagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Alternativamente, HZ24-PH20, (SEQ ID NO: 108, que codifica rHuPH20), PH20sHis, (SEQ ID NO: 187, que codifica PH20 etiquetada his) y HZ24-mut(B/S) (SEQ ID NO: 122, que codifica PH20 truncado en el aminoácido 482), se infectaron transitoriamente en cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina, incluyendo Lec1 (Cat No. CRL-1735, ATCC), Lec2 (Cat No. CRL-1736, ATCC), Lec8 (Cat No. CRL-1737, ATCC) y Pro-5 (Cat No. CRL-1781), usando GeneJuice® (Novagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En corto, las células CHO-S se mantuvieron en medio CD-CHO complementado con GlutaMax 8 mM. Las células mutantes CHO resistentes de lectina se hicieron crecer en medio DMEM complementado con FBS al 10%. Antes de la transfección, las células CHO se colocaron en placa en placas de cultivo celular de 10 cm, con aproximadamente $3x10^6$ células por pozo e hicieron crecer durante la noche en medio DMEM complementado con FBS al 10% a 37°C con CO_2 al 5%. El medio luego se removió y la monocapa de células se lavó 2 veces con 10 mL de medio libre de suero. 36 µL de GeneJuice® se mezcló con 1.2 mL de DMEM e

incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, 12 µg de ADN se agregó y mezcló suavemente. Después de incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, la mezcla de GeneJuice®/ADN se agregó gota a gota la monocapa de células CHO y la placa de cultivo celular se agitó suavemente para permitir el mezclado. La placa se incubó durante 4 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Después de 4 horas, el medio se reemplazó con 12 mL de medio CD DG44 libre de detergente complementado con Glutamax-1 y las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Después de la expresión, el medio y las células se cosecharon separadamente.

Ejemplo 3

Solubilidad de Mutantes de Eliminación de Terminal Carboxi de Hialuronidasa PH20 Humana

En este ejemplo, siguiendo la expresión transitoria, como se describe en el Ejemplo 2 de arriba, el medio y las células se cosecharon separadamente y analizaron para solubilidad y expresión PH20 por análisis Western blot. La solubilidad de los mutantes de truncamiento de terminal C se determinó al examinar si la proteína expresada estuvo presente en el medio de crecimiento o en las células. Los mutantes de eliminación de terminal C desde 455 hasta 472 aminoácidos de longitud, corresponden a las SEQ ID NOS: 55-65 y 99-101, contienen residuos de aminoácido del anclaje GPI que sirve para enlazar la proteína a la membrana celular. Las células que expresan estos mutantes se trataron con fosfoinositol-fosfolipasa C (PI-PLC), que escinde el anclaje GPI permitiendo la liberación de proteína soluble en el medio, y la presencia de PH20 en el medio resultante y las células se determinaron por análisis Western blot.

A. Análisis Western blot

Las muestras no reducidas se corrieron en un gel de Tris-Glicina

al 4-20% y transfirieron a la membrana PVDF usando iBlot (Invitrogen). Para el Western blot, se usó IgG anti-PH20 de conejo (0.5 µg/mL) como el anticuerpo primario y se usó IgG anti-conejo de cabra conjugado con HRP (0.1 ng/mL, Cat# DC03L, EMD) como el anticuerpo secundario. La evidencia de expresión se determina por una banda en aproximadamente 66 kDa, corresponde a la hialuronidasa PH20 humana recombinante.

B. Tratamiento PI-PLC

1. Expresión transitoria en placas de 6 pozos

Después de la expresión de rHuPH20 en células CHO-S durante 72 horas, como se describe en el Ejemplo 2A de arriba, el medio y las células se cosecharon separadamente. Las células se lavaron con medio libre de suero seguido por la adición de 2 mL de medio libre de suero por pozo. Se agregó PI-PLC (0.5 unidades/pozo) a cada pozo y las células se incubaron en el PI-PLC durante 2 horas. El medio resultante y las células se analizaron por análisis Western blot como se describe arriba.

2. Expresión transitoria en placas de cultivo de tejido de 10 cm

Dos placas cada una de células CHO-S que expresan rHuPH20, una para tratamiento con PI-PLC y una sin tratamiento con PI-PLC, se prepararon para cada mutante de terminal C como se describe en el Ejemplo 2B de arriba. Después de la expresión durante 48 horas, para células no tratadas con PI-PLC, el medio y las células se cosecharon separadamente. El medio de cultivo se centrifugó, concentró hasta un volumen de 10 mL, y solución amortiguadora intercambiada en PBS usando un concentrador Amicon 30kD MWCO. Las células se enjuagaron con PBS frío y rasparon y volvieron a suspender en 1.2 mL de PBS con inhibidor de proteasa Set III (Cat No. 539134, Calbiochem). Las células que se volvieron a suspender se sonicaron brevemente para preparar extracto de célula completa. Para tratamiento PI-PLC de células, después de la expresión durante 48 horas, el medio no tratado se cosechó, como se

describe arriba. Las células se enjuagaron una vez con medio CD DG44 fresco con Glutamax-1, y el medio se reemplazó con 12 mL de medio CD DG44 libre de detergente fresco complementado con Glutamax-1 con 3.0 unidades PI-PLC por disco, y las células se incubaron durante 2 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Después de 2 horas, el medio PI-PLC y las células se cosecharon separadamente, como se describe arriba. El medio no tratado resultante y las células, y medio tratado con PI-PLC y las células, se analizaron por Análisis Western blot como se describe arriba.

C. Resultados

Los resultados se describen en la Tabla 4 a continuación. Cuatro mutantes, ILFL (SEQ ID NO: 58), SILF (SEQ ID NO: 100), VSIL (SEQ ID NO: 59) e IVSI (SEQ ID NO: 101), muestran expresión baja de PH20. El análisis Western blot muestra los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana más cortos que F500 (SEQ ID NOS: 59-95 y 100-101) se expresan en el medio, como evidencia por una banda de proteína en aproximadamente 66 kDa. Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana con longitudes entre L501 y A507 (SEQ ID NOS: 55-58 and 99) se expresan en las células. Durante el tratamiento de estas células con PI-PLC, la hialuronidasa PH20 humana se libera del medio, como se evidencia por una banda de proteína en aproximadamente 66 kDa. El tratamiento de células de mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH20 humana, corresponden a las SEQ ID NOS: 59-65 y 100-101, con PI-PLC no tiene efecto ya que estas proteínas se expresaron inicialmente en el medio.

Tabla 4. Expresión mutante de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH20 humana.

Mutante	Maduro (AA)	Expresión de proteína	Expresado en medio	Expresado en medio Después de la adición de PI-PLC
SPAM1-VASL (SEQ ID NO:108)	474	SI	NO	SI
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	472	SI	NO	SI
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	470	SI	NO	SI
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	468	SI	NO	SI
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO:99)	467	SI	NO	SI
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	466	DÉBIL	NO	SI
SPAM1-SILF (SEQ ID NO:100)	465	DÉBIL	DÉBIL/SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	464	DÉBIL	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-IVSI (SEQ ID NO:101)	463	DÉBIL	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	462	SI	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-TMFI (SEQ ID	460	SI	SI	Inicialmente en el medio

NO:61)				
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	458	SI	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	456	SI	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-STLS (SEQ ID NO:65)	455	SI	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	454	SI	SI	Inicialmente en el medio
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	452	SI	SI	n/a
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO:67)	450	SI	SI	n/a
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO:68)	449	SI	SI	n/a
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO:69)	448	SI	SI	n/a
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO:70)	447	SI	SI	n/a
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO:71)	446	SI	SI	n/a
SPAM1-EPQI (SEQ ID NO:72)	445	SI	SI	n/a
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO:73)	444	SI	SI	n/a
SPAM1-TEEP (SEQ ID NO:74)	443	SI	SI	n/a

SPAM1-ETEE (SEQ ID NO:75)	442	SI	SI	n/a
SPAM1-METE (SEQ ID NO:76)	441	SI	SI	n/a
SPAM1-PMET (SEQ ID NO:77)	440	SI	SI	n/a
SPAM1-PPME (SEQ ID NO:78)	439	SI	SI	n/a
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO:79)	438	SI	SI	n/a
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO:80)	437	SI	SI	n/a
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO:81)	436	SI	SI	n/a
SPAM1-AFLK (SEQ ID NO:82)	435	SI	SI	n/a
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO:83)	434	SI	SI	n/a
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO:84)	433	SI	SI	n/a
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO:85)	432	SI	SI	n/a
SPAM1-VCID (SEQ ID NO:86)	431	SI	SI	n/a
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO:87)	430	SI	SI	n/a
SPAM1-DGVC	429	SI	SI	n/a

(SEQ ID NO:88)				
SPAM1-IADG (SEQ ID NO:89)	427	SI	SI	n/a
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO:90)	425	SI	SI	n/a
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO:91)	423	SI	SI	n/a
SPAM1-DAVD (SEQ ID NO:92)	421	SI	SI	n/a
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO:93)	419	SI	SI	n/a
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO:94)	417	SI	SI	n/a
SPAM1-ADVK (SEQ ID NO:95)	415	SI	SI	n/a

Ejemplo 4

Solubilidad de Mutantes de Eliminación de Terminal Carboxi de Hialuronidasa PH Humana Usando Ensayo de Triton® X-114

En este ejemplo, la solubilidad de los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana se probó usando un ensayo Triton® X-114. En este ensayo, las hialuronidasas de PH20 soluble se dividirán en la fase acuosa de una solución Triton® X-114 calentada hasta 37°C (modificación como se describe por Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7) mientras que las hialuronidasas PH20 ancladas a la membrana se dividirán en la fase rica en detergente.

Para este propósito, Triton® X-114 al 2% (v/v) en PBS a 0°C se agregó a 200 µL de medio de cultivo de tejido o extracto celular, como

se prepara en el Ejemplo 3B de arriba, y las muestras se incubaron en hielo. Para la separación, la muestra se revistió en un cojín de sacarosa 30 µL (p/v al 6%) que contiene Triton® X-114 al 0.06% a 4°C en un tubo de microfuga. Las muestras se calentaron hasta 37°C durante 3 minutos para inducir separación de fase y centrifugaron durante 3 min a 4000g a temperatura ambiente. Las fases acuosas y de detergente se removieron para análisis SDS-PAGE y Western blotting. Se usó IgG anti-PH20 de conejo (0.5 µg/mL) como el anticuerpo primario y se usó IgG anti-conejo de cabra conjugado con HRP (0.1 ng/mL, Cat# DC03L, EMD) como el anticuerpo secundario. El PH20 humano de longitud completa, que divide con fuerza en la fase de detergente, se usó como un control.

Los resultados de la solubilidad de los mutantes de eliminación de terminal carboxi se muestran en la Tabla 5. Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana hasta F500 (precursor SEQ ID NOS: 7-13 y 48-49 o SEQ ID NOS: 59-65 y 100-101 maduro) se dividen en la fase acuosa y son por lo tanto solubles. Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana más largos que F500 (SEQ ID NOS: 55-58 y 99) se dividen en la fase de detergente y son insolubles. El PH20 de longitud completa también es insoluble.

Tabla 5. Solubilidad de mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana			
Mutante	SEQ ID NO	Maduro (AA)	Soluble
SPAM1-VASL	108	474	NO
SPAM1-SSVA	55	472	NO
SPAM1-IISS	56	470	NO
SPAM1-FLII	57	468	NO
SPAM1-LFLI	99	467	NO
SPAM1-ILFL	58	466	NO
SPAM1-SILF	100	465	SI
SPAM1-VSIL	59	464	SI
SPAM1-IVSI	101	463	SI
SPAM1-FIVS	60	462	SI
SPAM1-TMFI	61	460	SI
SPAM1-SATM	62	458	SI
SPAM1-TLSA	63	456	SI
SPAM1-PSTL	64	454	SI
SPAM1-STLS	65	455	SI

Ejemplo 5

Actividad de Hialuronidasa de Mutantes de Eliminación de Terminal Carboxi de Hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana se probaron por su actividad de hialuronidasa PH20 usando un ensayo de microtitulación con ácido hialurónico biotinilado (HA o bHA biotinilado). Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana se probaron para actividad de hialuronidasa en tanto pH 7.4 como pH 5.5.

En resumen, una placa de 96 pozos 4xBHX se recubrió con HA biotinilado (1.1 MDa). El sobrenadante de transfección después de 72 horas de las células transfectadas con mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana, se diluyó en solución amortiguadora en ya sea pH 7.4 o pH 5.5 y agregó a pozos individuales de la placa y permitió incubar a 37°C durante 90 minutos. La reacción

se completó por adición de HCl de guanidina 4M. Los pozos se lavaron 4x con Solución Amortiguadora Salina de Fosfato con Tween20 (PBST) para remover cualquier HA biotinilado digerido seguido por adición de estreptavidina-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 4x con PBST y la placa se desarrolló con TMB. La placa se leyó en 450 nm usando un lector de placa ELISA. La actividad de hialuronidasa (en unidades/mL) se determinó al interpolar la absorbancia medida en 450 nm con una curva estándar de referencia de hialuronidasa. La hialuronidasa PH20 humana madura de longitud completa y células CHO no transfectadas se usaron como controles positivos y negativos.

Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 6A, a continuación. Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana más cortos que I430, corresponden a SPAM1-GDVC para SPAM1-ADVK (SEQ ID NOS: 88-95), están inactivos. Los mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana finalizados en I498 (SEQ ID NO: 101), L499 (SEQ ID NO: 59), F500 (SEQ ID NO: 100), L501 (SEQ ID NO: 58) y I502 (SEQ ID NO: 99) tienen poca actividad detectable debido al bajo nivel de expresión. Todos los otros mutantes de eliminación de terminal carboxi de hialuronidasa PH humana (SEQ ID NOS: 55-57 y 60-87) son hialuronidasas activas en tanto pH 7.4 como pH 5.5.

Tabla 6. Actividad de hialuronidasa

Mutante de eliminación	Precursor (AA)	Maduro (AA)	Actividad de pH 7.4 (Unidades/ ml)	Acitividad de pH 5.5 (Unidades/ ml)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO: 55)	507	472	1.4715	1.125
SPAM1-IISS (SEQ ID NO: 56)	505	470	1.458	0.837
SPAM1-FLII (SEQ ID NO: 57)	503	468	0.9405	0.6345
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO: 58)	501	466	0.0405	0.0405
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO: 59)	499	464	0.02025	0.045
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO: 60)	497	462	0.1755	0.216
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO: 61)	495	460	0.45	0.612
SPAM1-SATM (SEQ ID NO: 62)	493	458	0.5715	0.7335
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO: 63)	491	456	0.3645	0.5625
SPAM1-STLS (SEQ ID NO: 65)	490	455	0.819	1.2375
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO: 64)	489	454	1.557	1.089
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO: 66)	487	452	1.017	0.9225
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO: 67)	485	450	1.8765	1.74825
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO: 68)	484	449	1.4985	1.26225
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO: 69)	483	448	2.45025	2.3085
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO: 70)	482	447	2.03175	1.647
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO: 71)	481	446	1.818	1.701

SPAM1-EPQI (SEQ ID NO: 72)	480	445	2.1825	1.6425
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO: 73)	479	444	1.917	2.0745
SPAM1-TEEP (SEQ ID NO: 74)	478	443	1.764	1.584
SPAM1-ETEE (SEQ ID NO: 75)	477	442	2.088	2.0475
SPAM1-METE (SEQ ID NO: 76)	476	441	1.332	1.278
SPAM1-PMET (SEQ ID NO: 77)	475	440	2.223	2.0925
SPAM1-PPME (SEQ ID NO: 78)	474	439	1.2105	1.341
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO: 79)	473	438	0.8595	0.91575
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO: 80)	472	437	0.5445	0.9
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO: 81)	471	436	3.321	2.79
SPAM1-AFLK (SEQ ID NO: 82)	470	435	3.204	2.925
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO: 83)	469	434	2.3895	2.2365
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO: 84)	468	433	0.5625	0.62775
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO: 85)	467	432	0.5535	0.4725
SPAM1-VCID (SEQ ID NO: 86)	466	431	0	0.2115
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO: 87)	465	430	0.441	0.468
SPAM1-DGVC (SEQ ID NO: 88)	464	429	0	0.045
SPAM1-IADG (SEQ ID NO: 89)	462	427	0	0.00225
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO: 90)	460	425	0	0.0135
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO: 91)	458	423	0.0495	0.0585

SPAM1-DAVD (SEQ ID NO: 92)	456	421	0	0.0675
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO: 93)	454	419	0	0.054
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO: 94)	452	417	0.054	0.0225
SPAM1-ADVK (SEQ ID NO: 95)	450	415	0.063	0.0405
VASL (SEQ ID NO: 108)	509	474	1.8045	0.891
VASL + PLC (SEQ ID NO: 108)	509	474	3.96	2.313
HZ24-PH20 (SEQ ID NO: 109)	482	447	0.499	0.726188
CHO-S	n/a	n/a	0	0.012375

Tabla 6A. Actividad de hialuronidasa

Mutante de eliminación	Precursor (AA)	Maduro (AA)	Acitividad de pH 7.4 (Unidades/ ml)	Actividad de pH 5.5 (Unidades/ ml)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO: 55)	507	472	1.782	1.256
SPAM1-IISS (SEQ ID NO: 56)	505	470	1.863	0.932
SPAM1-FLII (SEQ ID NO: 57)	503	468	1.094	0.648
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO: 99)	502	467	0.608	0.324
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO: 58)	501	466	0.446	0.122
SPAM1-SILF (SEQ ID NO: 100)	500	465	0.365	0.162
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO: 59)	499	464	0.486	0.122
SPAM1-IVSI (SEQ ID NO: 101)	498	463	0.527	0.203
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO: 60)	497	462	0.365	0.162
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO: 61)	495	460	0.689	0.770
SPAM1-SATM	493	458	0.689	0.851

(SEQ ID NO: 62)				
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO: 63)	491	456	0.851	0.729
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO: 64)	489	454	1.985	3.321
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO: 66)	487	452	1.134	1.580

Ejemplo 6

Análisis de glicano de rHuPH20 por CL-EM

En este ejemplo, un estudio de análisis de glicano de rHuPH20 (SEQ ID NO: 122) se realizó por análisis de espectros de masas de PH20 digerida de tripsina.

Brevemente, rHuPH20 (como se produce en el Ejemplo 15C), se liofilizó y volvió a suspender en solución amortiguadora que contiene HCL de guanidina 6M, EDTA 0.002 M y Tris 0.02 M, pH 8.28 a una concentración final de 0.5 mg/mL. Se agregó DTT (concentración final 10 mM) y la mezcla de proteína/DTT se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la reducción, se agregó yodoacetamida a una concentración final de 20 mM. Finalmente, se agregó tripsina (1:25 p/p) y la mezcla se incubó durante 20 horas a 37°C.

Las digestiones trípticas se analizaron por CL-EM. Brevemente, las digestiones trípticas se inyectaron en una columna de fase inversa C18 usando las condiciones establecidas en la Tabla 7 a continuación. Los datos EM se recolectaron en un espectrómetro de masa Q-TOF Ultima usando ionización por electrorocío (ESI) en modo de ión positivo. Los datos se adquirieron de m/z 200-1950 en modo EM. Los glicopéptidos se analizaron usando software GlycoMod (www.expasy.ch/tools/glycomod/) para determinar el tipo de glicano.

Tabla 7. Parámetros y ajustes CL-EM			
Parámetro	Ajuste		
Columna	Phenomenex Synergi Hydro-RP		
Temperatura de la columna	30°C		
Fase móvil A	Agua desionizada que contiene ácido fórmico al 0.2%		
Fase móvil B	Acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0.2%		
Gradiente	Tiempo (min)	%A	%B
	0.0	97.0	3.0
	5.0	97.0	3.0
	144.0	60.0	40.0
	150.0	10.0	90.0
	160.0	10.0	90.0
	161.0	97.0	3.0
	180.0	97.0	3.0
Velocidad de flujo	0.2 mL/min		
Volumen de inyección	5 µL		
Tiempo de corrida (total)	180 minutos		

La hialuronidasa PH20 humana tiene un sitio O-glicosilación en T475. El sitio se ocupa por un glicano tipo 1 de núcleo que tiene uno o más ácidos siálicos. El rHuPH20 está glicosilado en seis residuos de asparagina diferentes, incluyendo N82, N166, N235, N254, N368, y N393. Los resultados muestran que N254 está aproximadamente 75% ocupado, N393 está aproximadamente 85% ocupado, y los cuatro sitios restantes, N82, N166, N235 y N368, están mayor que 99% ocupado. Todos de los tres tipos de N-glicanos, manosa alta, tipos de híbrido y complejo, están presentes en rHuPH20. En general, rHuPH20 contiene alrededor de 45% de glicanos de manosa alta, 45% de glicanos de complejo y 10% de glicanos híbridos. Alrededor de 35% de los glicanos totales son aniónicos, de los cuales 25% contienen un ácido siálico y el 10% restante contiene un grupo aniónico desconocido, posiblemente un grupo fosfato. La mayoría

de los glicanos de complejo están fucosilados y los glicanos de complejo aniónicos contienen en su mayor parte un ácido siálico mientras que unos pocos de estos contienen dos ácidos siálicos. Cada residuo de asparagina tiene alrededor de 90% de un tipo de glicano y una proporción pequeña de los otros dos tipos de glicanos, con la excepción de N235. El tipo de glicano principal para cada residuo se establece en la Tabla 8 a continuación. Los residuos N82, N166 y N254 están ocupados por glicanos de complejo. Los residuos N368 y N393 están ocupados por glicanos de manosa alta. El residuo N235 está ocupado por aproximadamente 80% de glicanos de manosa alta, con aproximadamente 20% de glicanos de complejo.

Tabla 8. Tipos de N-glicanos en residuos de asparagina en rHuPH20

Sitio de Glicano	Glicanos de manosa alta	Glicanos de complejo
N82		X
N166		X
N235	~ 80%	~ 20%
N254		X
N368	X	
N393	X	

Ejemplo 7

Desglicosilación de Hialuronidasa PH20 Humana por tratamiento con Endoglicosidasas

En este ejemplo, la hialuronidasa PH20 humana se desglicosiló por tratamiento de rHuPH20 purificado (SEQ ID NO: 122) con varias glicosidasas y se evaluó la actividad de hialuronidasa. La hialuronidasa PH20 humana está glicosilada en seis diferentes residuos de asparagina, incluyendo N82, N166, N235, N254, N368, y N393. Cinco glicosidasas se usaron para generar hialuronidasa PH20 humana

desglicosilada, incluyendo: PNGaseF (New England Biolabs, Cat. No. P0704S, Lot #34), que escinde todos los N-glicanos; EndoF1, que escinde manosa alta y glicanos tipo híbrido; EndoF2, que escinde glicanos tipo complejo biantenarios; EndoF3, que escinde glicanos de complejo biantenario y más ramificados; y EndoH (New England Biolabs, Cat. No. P0702S), que escinde manosa alta y glicanos tipo híbrido. Por lo tanto, el tratamiento con PNGaseF resultada en desglicosilación completa mientras que el tratamiento con endoglicosidasas resultada en sólo desglicosilación parcial.

Para la desglicosilación completa, rHuPH20 purificado (0.1 mg/mL de concentración final) se incubó con PNGaseF (50,000 unidades/mL) en solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7.2 durante la noche a 37°C. Para desglicosilación parcial, rHuPH20 purificado (0.5 mg/mL de concentración final) se incubó con 0.3 unidades/mL de endoglicosidasa (ya sea EndoF1, EndoF2, EndoF3 o EndoH) o una mezcla de las cuatro endoglicosidasas en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM pH 5.0 durante la noche a 35°C. La desglicosilación de rHuPH20 se analizó por el cambio en la movilidad de PH20 por SDS-PAGE. La actividad enzimática de hialuronidasa se determinó como se describe en el Ejemplo 5.

La hialuronidasa PH20 humana tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa. El tratamiento con EndoF1, EndoH o una mezcla de EndoF1, EndoF2, EndoF3 y EndoH resulta en hialuronidasa PH20 humana parcialmente desglicosilada como se determina por cambio de movilidad SDS-PAGE a un peso molecular de aproximadamente 56 kDa. El tratamiento con PNGaseF resulta en desglicosilación completa de hialuronidasa PH20 humana. La desglicosilación parcial de rHuPH20 no resulta en inactivación de actividad enzimática de hialuronidasa mientras que la digestión exhaustiva con PNGaseF para remover completamente N-glicanos resulta en la pérdida total de actividad enzimática de hialuronidasa (ver Tabla 9 a continuación).

Tabla 9. Efecto del tratamiento de glicosidasa en actividad rHuPH20							
rHuPH20 (U/ml)	Control PH20	EndoF1	EndoF2	EndoF3	EndoH	EndoF1, F2,F3,H	PNGaseF
1.0000	0.3195	0.2983	0.2573		0.2965	0.2144	1.9315
0.2000	0.7910	0.7656	0.6048	0.5880	0.7435	0.5366	1.9173
0.0400	1.4299	1.3450	1.3117	1.2255	1.3584	1.3877	1.9926
0.0080	1.8397	1.7338	1.6900	1.6698	1.6998	1.8418	1.9172

Ejemplo 8

Tratamiento de Hialuronidasa PH20 humana con inhibidores de Glicosilación

En este ejemplo, rHuPH20 (SEQ ID NO: 122) se expresó transitoriamente en la presencia de cada uno de dos inhibidores de glicosilación y se evaluación la secreción y actividad de hialuronidasa. La Kifunensina es una manosidasa I de inhibidor potente, una enzima involucrada en el procesamiento de glicano (ver por ejemplo, Elbein et al., *J Biol Chem*, 265:15599-15605 (1990)). La Tunicamicina es una mezcla de antibióticos de nucleósido homóloga que inhibe la enzima GlcNAc fosfo-transferasa (GPT), por ello bloquea la síntesis de todos los N-glicanos (ver por ejemplo, Böhme et al., *Eur. J. Biochem.* 269:977-988 (2002)).

Brevemente, $1x10^6$células HZ24-2B2 que expresan rHuPH20 (ver Ejemplo 14 a continuación) se sembraron en medio CD-CHO completo de 24 mL en dos matraces de 125 mL. La Tunicamicina (disuelta en DMSO) o Kifunensina (frescamente disuelta en agua) se agregó a una concentración final de 5 µg/mL (que contiene 12 µL DMSO). Como un control, un matraz se sembró con $1x10^6$ células HZ24-2B2 que expresan

rHuPH20 y 12 µL DMSO se agregó como un control de vehículo. Después de la adición de ya sea tunicamicina o kifunensina, las células se incubaron durante 4-6 horas a 37°C con CO_2 al 5%. Después de la expresión, un cultivo de 2 mL se removió y centrifugó durante 5 minutos a 500g. El sobrenadante se almacenó a 4°C y los peletizados celulares se almacenaron a -20°C. Los cultivos de 22 mL restantes se centrifugaron durante 5 minutos a 500g. El sobrenadante se almacenó a 4°C. Las células se volvieron a suspender en medio CD-CHO completo de 22 mL en los dos matraces de 125 mL originales. Se agregó Tunicamicina o Kifunensina al cultivo a una concentración final de 5 µg/mL y las células se incubaron a 37°C con CO_2 al 5%. Los cultivos de dos mL (2 mL) se removieron de cada matraz en aproximadamente cada 24 horas después de cambiar el medio. Para cada punto de tiempo, el sobrenadante se almacenó a 4°C y los peletizados celulares se almacenaron a -20°C. La expresión de rHuPH20 se analizó por análisis Western blot y la actividad de hialuronidasa se midió usando el ensayo enzimático HA biotinilado (como se describe en los Ejemplos 3 y 5 de arriba).

Los resultados se muestran en las Tablas 10-13 a continuación, que establecen el número de células viables y la actividad PH20. Como se muestra en las Tablas 10-11, tunicamicina inhibe la actividad PH20 en tanto medio de cultivo de tejido como dentro de la célula y también resulta en una pérdida completa de viabilidad celular. Adicionalmente, una hora del tratamiento con tunicamicina resulta en la acumulación de hialuronidasa PH20 humana desglicosilada dentro de la célula, como se determina por cambio de movilidad SDS-PAGE a un peso molecular de aproximadamente 56 kDa en las fracciones de peletizado celular. Como se muestra en las Tablas 12-13, kifunensina no afecta la actividad de PH20 mientras que el análisis Western blot revela que kifunensina inhibe la expresión y secreción de rHuPH20 en células tratadas.

Tabla 10. Efecto de Tunicamicina en Viabilidad Celular y actividad PH20 en Medio de Cultivo de Tejido

Tiempo (horas)	Con Tunicamicina		Sin Tunicamicina	
	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)
0	1.04	0.50	1.04	0.00
1	1.04	2.80	1.04	1.50
2	1.04	5.00	1.04	3.00
4	0.910	8.80	1.30	7.00
25	1.08	5.80	1.32	82.50
49	0.200	6.80	2.72	171.30
73	0.080	7.80	3.80	331.00
91	0	7.50	6.25	313.30

Tabla 11. Efecto de Tunicamicina en Viabilidad Celular y actividad PH20 en Peletizados Celulares

Tiempo (horas)	Con Tunicamicina		Sin Tunicamicina	
	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)
0	1.04	34.50	1.04	35.00
1	1.04	38.00	1.04	38.10
2	1.04	34.00	1.04	36.60
4	0.910	18.00	1.30	31.90
25	1.08	1.00	1.32	14.40
49	0.200	0.80	2.72	33.10
73	0.080	0.30	3.80	67.50
91	0	0.30	6.25	79.40

Tabla 12. Efecto de Kifunensina en Viabilidad Celular y actividad PH20 en Medio de Cultivo de Tejido				
Tiempo (horas)	Con Kifunensina		Sin Kifunensina	
	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)
0	1	0.4	1	0.45
6	1	23.85	1	15.75
24	1.2	129.6	1.4	75.6
50	2.1	299.7	2.4	206.55
72	3	535.95	4.4	444.15
96	3.7	945	6.3	726.3
144	5.8	2968.65	8.5	2241

Tabla 13. Efecto de Kifunensina en Viabilidad Celular y actividad PH20 en Peletizados Celulares				
Tiempo (horas)	Con Kifunensina		Sin Kifunensina	
	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)	Células Viables ($x10^6$)	Actividad PH20 (U/mL)
0	1	22.25	1	23
6	1	21.25	1	27
24	1.2	27.75	1.4	14.45
50	2.1	43	2.4	26
72	3	98.75	4.4	52.75
96	3.7	208.75	6.3	167.5
144	5.8	497.25	8.5	107

Ejemplo 9

Expresión transitoria de rHuPH20 en mutantes CHO resistentes de lectina

En este ejemplo, rHuPH20 se expresó transitoriamente en cuatro mutantes CHO resistentes de lectina y se evaluaron la secreción y actividad de hialuronidasa. Los mutantes CHO resistentes de Lectina se

resumen en la Tabla 14 a continuación. Las células Pro$^-$5 carecen de la galactosiltransferasa β4galT-6 causando una reducción en *N*-glicanos galactosilados (ver, por ejemplo, Lee et al. *J. Biol. Chem.* 276:13924-13934 (2001)). Las células Lec1 carecen de la actividad de *N*-acetilglucosaminiltranferasa I y por lo tanto no sintetizan los glicanos de complejo o híbridos (ver, por ejemplo, Chen and Stanley, *Glycobiology*, 13:43-50 (2003)). La Lec2 y Lec8 son deficientes en transportadores de nucleótido-azúcar, que transportan nucleótido-azúcar a través de la membrana ER o golgi. Las células Lec2 son incapacer de transubicar el CMP-ácido siálico (particularmente CMP-NeuAc) por lo tanto provocan la expresión de superficies de célula asialo (ver, por ejemplo, Eckhardt et al., *J. Biol. Chem.* 273:20189-20195 (1998)). Las células Lec8 son incapaces de transubicar UDP-galactosa por lo tanto provocan glicanos desprovistos de galactosa (ver, por ejemplo, Bakker et al., *Glycobiology*, 15:193-201 (2005)).

Tabla 14. Mutantes CHO resistentes a Lectina

Línea CHO	Cambio bioquímico	Cambio genético
Pro$^-$5 (precursor)	↓ Gal en N-glicanos	Sin expresión de *β4galt6*
Lec1	↓ GlcNAc-TI	Inserción/eliminación en *Mgat1* ORF
Lec2	↓ transportador Golgi de CMP-ácido siálico	Mutación en *Slc35a1* ORF
Lec8	↓ transportador Golgi de UDP-Gal	Mutación en *Slc35a2* ORF

En breve, PH20sHis (que codifica PH20 etiquetado his, SEQ ID NO: 187) se expresó transitoriamente en cada una de cuatro cepas de mutantes CHO resistentes a lectina, incluyendo Lec1 (Cat No. CRL-1735, ATCC), Lec2 (Cat No. CRL-1736, ATCC), Lec8 (Cat No. CRL-1737, ATCC) y Pro$^-$5 (Cat No. CRL-1781) como se describe en el Ejemplo 2A de arriba. Adicionalmente, HZ24-mut(B/S) (que codifica PH20 truncado en aminoácido

482, SEQ ID NO: 122) se expresó transitoriamente en células Pro⁻5 y como control negativo, las células Pro⁻5 se sometieron a una transfección simulada. El medio de cultivo celular resultante se analizó por análisis Western blot y se midió la actividad de hialuronidasa usando el ensayo enzimático HA biotinilado (como se describe en los Ejemplos 3 y 5 de arriba).

Los resultados muestran que rHuPH20 expresado en los mutantes Lec se secreta en el medio, como evidencia por una banda de proteína en aproximadamente 66 kDa. Los resultados del ensayo enzimático bHA se establecen en la Tabla 15 a continuación, que se establece para el mutante CHO resistente a lectina, el PH20 que codifica el plásmido usado para transfectar las células, y la actividad PH20 en pH5.5 para tanto una dilución 1:27 como 1:81. El rHuPH20 expresado por células mutantes Lec está enzimáticamente activo.

Tabla 15. Actividad PH20 (U/mL) de rHuPH20 transitoriamente expresado en células mutantes Lec.

Mutante de Lectina	Pro-5	Pro-5	Lec1	Lec2	Lec8	Pro-5
Plásmido	HZ24-mut(B/S)	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	Transfección Mock
Actividad PH20 (1:27)	0.6615	0.297	0.54	0.675	0.2565	0.081
Actividad PH20 (1:81)	1.1745	0.6075	0.7695	1.053	0.567	0.1215

Ejemplo 10

Mutagénesis dirigida al sitio de Sitios de N-glicosilación de Hialuronidasa PH20 humana

En este ejemplo, los mutantes de desglicosilación de hialuronidasa PH20 humana específicos del sitio de N-glicano se generaron y se midieron sus patrones de secreción y actividad

enzimática de hialuronidasa. Los mutantes de desglicosilación específicos del sitio N-glicano y tipos de glicano se establecen en la Tabla 16 a continuación.

Se usó PH20sHis (SEQ ID NO: 210) como una plantilla para mutagénesis de cada residuo de asparagina a alanina usando Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange® (Cat No. 200518, Stratagene). La proteína codificada por el ADN de plantilla corresponde a PH20sHis (SEQ ID NO: 187), un clon PH20 humano que contiene una etiqueta HexaHis (SEQ ID NO: 142) después del aminoácido S490. El PH20sHis de tipo natural y mutantes desglicosilados se establecen en la Tabla 16. Se generaron seis mutantes sencillos, uno para cada uno de los sitios de N-glicosilación. Adicionalmente, se generaron tres mutantes dobles y un mutante triple para asparaginas N82, N166 y N254, todos de los cuales se ocupan por glicanos tipo complejo. Finalmente, se generó un mutante doble N368A/N393A, que carece de glicanos de manosa alta. Los mutantes se transfectaron en células CHO-S y se realizó la expresión como se describe en el Ejemplo 2A. La secreción en el medio y la actividad de hialuronidasa se determinaron como se describe en los Ejemplos 3 y 5, de arriba.

Los resultados se muestran en la Tabla 16 a continuación, que establece la mutación, los tipos de glicano, si la proteína se secretó en el medio y la actividad de hialuronidasa en tanto pH 5.5 como pH 7.4. El análisis Western blot muestra que la mutación de los residuos N82, N166, N235 y N254 no tiene efecto en la secreción de la proteína rHuPH20 en el medio. Alternativamente, la mutación de los residuos N368A y N368A/N393A previene la expresión y secreción de PH20, como evidencia por una carencia de proteína en aproximadamente 66 kDa en el medio. La mutación del residuo N393A resulta en expresión de proteína reducida, pero rHuPH20 se observó en el medio, como evidencia por una banda de proteína en aproximadamente 66 kDa. La mutación de los residuos N82, N166 y/o N254 no tiene efecto en la actividad rHuPH20.

Estos residuos se ocupan por glicanos de complejo. En contraste, la mutación de los residuos N235, N368 y/o N393, que contiene glicanos de manosa alta, resulta en una pérdida completa de actividad detectable en el medio debido a una carencia de secreción.

Tabla 16. Mutantes de Desglicosilacion de Hialuronidasa PH20 Humana

Mutante	SEQ ID NO	Tipo de glicano	Secreción	Actividad pH 5.5	Actividad pH 7.4
PH20sHis (parent)	187	Ambos	SI	SI	SI
N82A	202	Complejo	SI	SI	SI
N166A	203	Complejo	SI	SI	SI
N235A	204	Manosa alta (80%) Complejo (20%)	SI	NO	NO
N254A	205	Complejo	SI	SI	SI
N368A	188	Manosa alta	NO	NO	NO
N393A	189	Manosa alta	SI (DÉBIL)	NO	NO
N82A/N166A	206	Complejo	SI	SI	SI
N82A/N254A	207	Complejo	SI	SI	SI
N166A/N254A	208	Complejo	SI	SI	SI
N82A/N166A/N254A	209	Complejo	SI	SI	SI
N368A/N393A	190	Manosa alta	NO	NO	NO

El análisis inmunofluorescente de células CHO con un anticuerpo anti-PH20 se usó para visualizar la expresión de los mutantes de desglicosilación específicos del sitio N-glicano N368A, N393A y N368A/N393A. Las células CHO se sembraron para cultivo de monocapa en portaobjetos de cámara de 8 pozos con 200 µL de células en 2.5 x 10^4 células por ml de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene suero de bovino fetal al 10% (FBS) e hicieron crecer a 37°C en

una atmósfera humidificada de CO_2 al 5%. Las células se transfectaron 36 horas después en confluencia al 80% usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) como sigue. El ADN (0.4 µg en 50 µL de DMEM sin suero) y Lipofectamine™ 2000 (1 µL en DMEM sin suero) se mezclaron suavemente durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego agregaron a cada pozo que contiene las células y 100 µL de medio libre de suero. El mezclado se efectuó al balancear suavemente la placa una y otra vez. Las células luego se incubaron a 37°C en una incubadora CO_2 durante 4-6 horas después de lo cual el medio se reemplazó con medio que contiene FBS al 10%. En 48 horas post-transfección, las células en los portaobjetos de cámara se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Las células se lavaron 3x con PBS y se agregó 200 µL de una solución NP-40/PBS al 1% y incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3x con PBS y almacenó a 4°C antes del inmunoetiquetado.

Para inmunoetiquetar las células, las muestras se bloquearon con suero de cabra normal al 15% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con una solución 1:20 de IgG de conejo anti-PH20 diluido en suero de cabra normal al 5% en PBS durante 2 horas. Finalmente, las células se lavaron 3x con PBS seguido por incubación con un IgG anti-conejo de cabra conjugado FITC durante 1 hora seguido por visualización. Además, la solución creciente que contiene DAPI se permite para tinción del núcleo. El análisis inmunofluorescente usando el anticuerpo anti-PH20 muestra que las mutaciones N368A y N393A provocan PH20 para acumularse dentro de las células.

Resumen de los estudios de N-glicosilación

Como se muestra en los Ejemplos 7-10 de arriba, la glicosilación ligada a N es esencial para pliegue apropiado y actividad enzimática de rHuPH20. La desglicosilación completa de rHuPH20, efectuada por

digestión exhaustiva con PNGaseF o por inhibición de glicosilación durante la biosíntesis por el tratamiento con tunicamicina, elimina toda la actividad enzimática detectable. Además, el rHuPH20 no glicosilado se mostró para acumularse en la célula. En contraste, el rHuPH20 parcialmente desglicosilado, efectuado por el tratamiento con kifunensina o por expresión en mutantes Lec, mantiene la actividad enzimática. Finalmente, el análisis de mutación detallado usando mutagénesis dirigida al sitio revela que la presencia de glicanos tipo manosa alta es necesaria para la producción de rHuPH20 enzimáticamente activo, soluble.

Ejemplo 11

Generación de una línea celular que expresa rHuPH20 soluble

El plásmido HZ24 (establecido en la SEQ ID NO: 140) se usó para transfectar Ovario de Hámster Chino (células CHO) (ver *por ejemplo* Solicitud de Patente de E.U.A. Nos. 10,795,095, 11/065,716 y 11/238,171). El vector de plásmido HZ24 para expresión de rHuPH20 soluble contiene una estructura del vector pCI (Promega), ADN que codifica aminoácidos 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO: 110), un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) del virus ECMV (Clontech), y el gen de reductasa de dihidrofolato de ratón (DHFR). La estructura del vector pCI también incluye ADN que codifica el gen de resistencia de Beta-lactamasa (AmpR), un origen f1 de replicación, una región potenciadora/promotora temprana inmediata de Citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una señal de poliadenilación tardía SV40 (SV40). El ADN que codifica el constructo de rHuPH20 soluble contiene un sitio NheI y una secuencia de consenso Kozak antes de que el ADN codifique la metionina en la posición 1 del aminoácido de la secuencia de señal del aminoácido 35 nativo de PH20 humano, y un codón de paro después de que el ADN codifica la tirosina correspondiente a la posición 482 del aminoácido

de la hialuronidasa PH20 humana establecida en la SEQ ID NO: 107, seguido por un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, resulta en una especie mARN sencilla conducida por el promotor CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 humano (establecida en la SEQ ID NO: 109 y aminoácidos 1-186 de reductasa de dihidrofolato de ratón (establecida en la SEQ ID NO: 141), separada por el sitio de entrada ribosomal interno (IRES).

Las células CHO DG44 no transfectadas que crecen en el medio CD-CHO modificado por GIBCO para células DHFR(-), complementado con Glutamina 4 mM y 18 ml/L de F68/L Pluriónico (Gibco), se sembraron en 0.5 x 10^6 células/ml en un matraz agitador en preparación para transfección. Las células se hicieron crecer a 37°C en CO_2 al 5% en una incubadora humidificada, agitando a 120 rpm. Las células CHO DG44 no transfectadas exponencialmente crecidas se probaron para viabilidad antes de la transfección.

Sesenta millones de células viables del cultivo de célula CHO DG44 no transfectado se peletizaron y volvieron a suspender a una densidad de 2 ×10^7 células en 0.7 mL de 2x de solución amortiguadora de transfección (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7.0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1.4 mM, dextrosa 12 mM). Para cada alícuota de células resuspendidas, se agregó 0.09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado por digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs), y las soluciones de célula/ADN se transfectaron en cubetas de electroporación 0.4 cm espacio BTX (Gentronics) a temperatura ambiente. Una electroporación de control negativo se realizó sin ADN plásmido mezclado con las células. Las mezclas de célula/plásmido se electroporaron con una descarga de capacidad de 330 V y 960 µF o en 350 V y 960 µF.

Las células se removieron de las cubetas después de la electroporación y transfirieron en 5 mL de medio CD-CHO modificado por

células DHFR(-), complementado con Glutamina 4 mM y 18 ml/L F68/L Pluriónico (Gibco), y se permitió crecer en un pozo de una placa de cultivo de tejido de 6 pozos sin selección durante 2 días a 37°C en CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Dos días después de la electroporación, 0.5 mL de medio de cultivo de tejido se removió de cada pozo y probó para la presencia de actividad de hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Actividad de Hialuronidasa Inicial de Células CHO DG44 Transfectadas con HZ24 en 40 horas después de la transfección

	Dilución	Actividad Unidades/ml
Transfección 1 330V	1 hasta 10	0.25
Transfección 2 350V	1 hasta 10	0.52
Control Negativo	1 hasta 10	0.015

Las células de la Transfección 2 (350V) se recolectaron del pozo de cultivo de tejido, contaron y diluyeron a 1 $\times 10^4$ hasta 2 $\times 10^4$ células viables por mL. Una alícuota de 0.1 mL de la suspensión celular se transfirió a cada pozo de cinco, placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pozos. Se agregaron cien microlitros de medio CD-CHO (GIBCO) que contiene complemento GlutaMAX™-1 4 mM (GIBCO™, Invitrogen Corporation) y sin complementos de hipoxantina y timidina a los pozos que contienen células (volumen final 0.2 mL).

Se identificaron diez clones de los 5 placas de crecimiento sin metotrexato (Tabla 18).

Tabla 18. Actividad de hialuronidasa de clones identificados	
Placa/Pozo ID	Hialuronidasa Relativa
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

Se expandieron seis clones HZ24 en cultivo y transfirieron en matraces agitadores como suspensiones celulares sencillas. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, y 4D10 se colocaron en placas en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pozos usando una estrategia de dilución infinita di-dimensional en la cual las células se diluyeron 1:2 debajo de la placa, y 1:3 a través de la placa, iniciando en 5000 células en el pozo izquierdo superior. Los clones diluidos se hicieron crecer en un fondo de 500 células CHO DG44 no transfectadas por pozo, para proporcionar factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en el cultivo. Diez placas se hicieron por subclon, con 5 placas que contienen metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produce 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato, y 11 del tratamiento de metotrexato 50 nM. Se midió la actividad de hialuronidasa importante en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (>50 Unidades/mL), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejido T-25. Los clones aislados del protocolo de tratamiento de metotrexato se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM. El clon 3D35M se expandió además en metotrexato 500 nM dando elevación a clones producidos en exceso de 1,000 Unidades/ml en matraces agitadores (clon 3D35M; o Gen1 3D35M). Un banco celular

principal (MCB) de las células 3D35M luego se preparó.

Ejemplo 12

Determinación de la actividad de hialuronidasa de rHuPH20 soluble

La actividad de hialuronidasa de rHuPH20 soluble en muestras tal como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones purificadas se determinó usando un ensayo turbidométrico, que está basado en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con albúmina de suero. Se mide la actividad al incubar rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo establecido de tiempo (10 minutos) y luego precipitar el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero acidificada. La turbidez de la muestra resultante se mide en 640 nm después de un periodo de desarrollo de 30 minutos. La disminución en turbidez resulta de la actividad de enzima en el sustrato de hialuronato de sodio es una medición de la actividad de hialuronidasa rHuPH20 soluble. El método se realiza usando una curva de calibración generada con diluciones de un estándar de referencia de trabajo de ensayo rHuPH20 soluble, y las mediciones de la actividad de muestra se hacen relativas a esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra se prepararon en Solución Diluyente de Enzima. La Solución Diluyente de Enzima se preparó al disolver 33.0 ± 0.05 mg de gelatina hidrolizada en 25.0 mL de la Solución amortiguadora de Reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5.5) y 25.0 mL de SWFI, y diluyendo 0.2 mL de solución de Buminato al 25% en la mezcla y colocando en vórtice durante 30 segundos. Esto se realizó dentro de 2 horas de uso y almacenó en hielo hasta que se necesitó. Las muestras se diluyeron a un estimado de 1-2 U/mL. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excede 1:100 y el tamaño de la muestra inicial para la primera dilución no fue menor que 20 µL. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo

fueron: Muestras en proceso, fracciones FPLC: 80 µL; Sobrenadantes de Cultivo de Tejido: 1 mL; Material Concentrado 80 µL; Material de Etapa Final o Purificado: 80 µL. Las diluciones se hicieron en triplicado en una placa de 96 pozos Enlazada a la Proteína Baja, y 30 µL de cada dilución se transfirió a placas de fondo negro/claro Optilux (BD BioSciences).

Las diluciones de rHuPH20 soluble conocidas con una concentración de 2.5 U/mL se prepararon en Solución Diluyente de Enzima para generar una curva estándar y agregar a la placa Optilux en triplicado. Las diluciones incluyen 0 U/mL, 0.25 U/mL, 0.5 U/mL, 1.0 U/mL, 1.5 U/mL, 2.0 U/mL, y 2.5 U/mL. Los pozos "blancos de reactivo" que contienen 60 µL de Solución Diluyente de Enzima se incluyeron en la placa como un control negativo. La placa luego se cubrió y entibió en un bloque de calor durante 5 minutos a 37°C. La cubierta se removió y la placa se agitó durante 10 segundos. Después de la agitación, la placa se regresó al bloque de calor y el Dispositivo de Manejo Líquido MULTIDROP 384 se cebó con la solución de 0.25 mg/mL hialuronato de sodio tibia (preparada al disolver 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20.0 mL de SWFI. Esto se mezcló por rotación y/o balanceo suave a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió completamente). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició al presiona la llave de inicio para dispensar 30 µL de hialuronato de sodio en cada pozo. La placa luego se removió del MULTIDROP 384 y agitó durante 10 segundos antes de transferirse a un bloque de calor con la cubierta de placa reemplazada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos.

El MULTIDROP 384 se preparó para detener la reacción al cebar la máquina con Solución de Trabajo de Suero y cambiando el ajuste de volumen hasta 240 µL. (25 mL de Solución Madre de Suero [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) se diluyó con 9 volúmenes de Solución Amortiguadora de Acetato 500 mM y el pH se ajustó hasta 3.1 con ácido

clorhídrico] en 75 mL de Solución Amortiguadora de Acetato 500 mM). La placa se removió del bloque de calor y colocó en el MULTIDROP 384 y 240 µL de Soluciones de Trabajo de suero se dispensó en los pozos. La placa se removió y agitó en un lector de placa durante 10 segundos. Después de unos 15 minutos adicionales, la turbidez de las muestras se midió en 640 nm y la actividad de hialuronidasa (en U/mL) de cada muestra se determinó por el ajuste a la curva estándar.

La actividad específica (Unidades/mg) se calculó al dividir la actividad de hialuronidasa (U/ml) por la concentración de proteína (mg/mL).

Ejemplo 13

Producción y Purificación de sPH20 Humano de Gen1

A. Proceso de Bioreactor de 5 L

Un vial de 3D35M se descongeló y expandió de matraces agitadores a través de matraces centrifugadores de 1 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) complementado con Metotrexato 100 nM y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Las células se transfirieron de matraces centrifugadores a un bioreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4 $\times 10^5$ células viables por ml. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura 37°C, pH 7.2 (punto de ajuste de partida), con punto de ajuste de Oxígeno disuelto al 25% y una sobrecapa de aire de 0-100 cc/min. En 168 hrs, se agregó 250 ml de Medio de Alimentación #1 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa). En 216 horas, se agregó 250 ml de Medio de Alimentación #2 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa y Butirato de sodio 10 mM), y en 264 horas se agregó 250 ml de Medio de Alimentación #2. Este proceso resulta en una productividad final de 1600 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 6 $\times 10^6$ células/ml. La adición de butirato de sodio fue potenciar dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción.

El medio acondicionado del clon 3D35M se clarificó por filtración de profundidad y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM pH 7.0. El rHuPH20 soluble luego se purificó por cromatografía secuencial en intercambio de iones de Q Sefarosa (Pharmacia), cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil Sefarosa (Pharmacia), cromatografía de fenil boronato (Prometics) e Hidroxapatita (Biorad, Richmond, CA).

El rHuPH20 soluble enlazado a Q Sefarosa y eluido a NaCl 400 mM en la misma solución amortiguadora. El eluido se diluyó con sulfato de amonio 2M a una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se pasó a través de una columna de Fenil (sub bajo), seguido por enlace bajo las mismas condiciones a una resina de fenil boronato. El rHuPH20 soluble se eluyó de la resina de fenil sefarosa en Hepes pH 6.9 después del lavado en pH 9.0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El eluido se cargó en una resina de hidroxiapatita cerámica en pH 6.9 en fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 1 mM y eluyó con fosfato de potasio 80 mM, pH 7.4 con $CaCl_2$ 0.1 mM.

El rHuPH20 soluble purificado resultante posee una actividad específica en exceso de 65,000 USP Unidades/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez (Ejemplo 12) usando el estándar de referencia USP. El sPH20 purificado eluido como un pico sencillo desde 24 hasta 26 minutos de una columna de estireno divinilbenceno Pharmacia 5RPC con un gradiente entre TFA/H_2O al 0.1% y TFA al 0.1%/acetonitrilo al 90%/H_2O al 10% y resuelto como una banda de 61 kDa amplia sencilla por electrofresis SDS que reduce a una banda de 51 kDa fuerte en el tratamiento con PNGASE-F. El procesado por secuencia de aminoácido de terminal N revela que el péptido líder se ha removido eficientemente.

B. Proceso de Expansión de Cultivo Celular Cadena Arriba en Cultivo Celular del Bioreactor de 100 L

Un proceso ampliado se usó para purificar separadamente rHuPH20 soluble de cuatro viales diferentes de célula 3D35M para producir 4

lotes separados de sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada vial se expandió separadamente y cultivó a través de un bioreactor de 125 L, luego purificó usando cromatografía de columna. Las muestras se tomaron en todo el proceso para evaluar tales parámetros como rendimiento de enzima. La descripción del proceso proporcionada a continuación establece especificaciones representativas para cosas tales como bioreactor de partida y volúmenes de medio alimentado, transferencia de densidades celulares, y lavado y elución de volúmenes. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 24 hasta 30.

Cuatro viales de células 3D35M se descongelaron en un baño de agua de 37°C, CD CHO que contiene metotrexato 100 nM y 40 mL/L GlutaMAX se agregó y las células se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio fresco y colocaron en un incubador de CO_2 al 7%, 37°C. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz de agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo e incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 6 L en 5 L de volumen de cultivo e incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 36 L en 20 L de volumen de cultivo e incubó a 37°C, CO_2 al 7%.

Un reactor de 125 L se esterilizó con vapor a 121°C, 1.406 kg/cm^2

(20 PSI) y se agregó 65 L de medio CD CHO. Antes del uso, el reactor se verificó por contaminación. Cuando la densidad celular en los matraces centrifugadores de 36 L alcanza 1.8 -2.5 x 10^6 células/mL, 20 L de cultivo celular celular se transfirieron de los matraces centriguadores de 36L al bioreactor de 125 L (Braun), resultando un volumen final de 85 L y una densidad de sembrado de aproximadamente 4 × 10^5 células/mL. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; pH: 7.2; oxígeno disuelto: 25% ± 10%; Velocidad Impulsora 50 rpm; Presión del Recipiente 0.2109 kg/cm^2 (3 psi); Aspersión de Aire 1 L/ min.; Sobrecapa de Aire: 1 L/min. El reactor se probó diariamente por cuentas celulares, verificación de pH, análisis del medio, producción y retención de la proteína. Las alimentaciones de nutriente se agregaron durante la corrida. En el día 6, se agregó 3.4 L del medio de alimentación #1 (CD CHO + 50 g/L Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1), y la temperatura de cultivo se cambió hasta 36.5°C. En el día 9, se agregó 3.5 L de Alimentacion #2 (CD CHO + 50 g/L Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambió hasta 36°C. En el día 11, se agregó 3.7 L de Alimentación #3 (CD CHO + 50 g/L Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió hasta 35.5°C. El reactor se cosechó en 14 días o cuando la viabilidad de las células cae debajo del 50%. El proceso resulta en la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 Unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. En la cosecha, el cultivo se probó para actividad de enzima y microscopia de electrón de transmisión (TEM), micoplasma, biocarga, endotoxina, y vírica *in vitro* e *in vivo*.

La cosecha de cultivo celular del bioreactor de cien litros se filtró a través de una serie de filtros de cápsula desechable que tienen un medio de poliétersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de profundidad 8.0 µm, una cápsula de profundidad 0.65 µm, una cápsula 0.22 µm, y finalmente a través de un filtro de 0.22 µm

Sartopore 2000 cm^2 y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo se concentró 10× usando dos TFF con filtros MWCO Spiral Poliétersulfona 30 kDa (Millipore), seguido por un intercambio de 6× solución amortiguadora con HEPES 10 mM, Na_2SO_4 25 mM, pH 7.0 en un filtro final 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La Tabla 19 proporciona datos de monitoreo relacionados con las etapas de cultivo, consecha, concentración e intercambio de solución amortiguadora celular.

Tabla 19. Datos de monitoreo para estapas de cultivo, cosecha, concentración e intercambio de solución amortiguadora celular.

Parámetro	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo de descongelación para inocular el bioreactor de 100 L (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación de 100 L (× 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 max. (× 10^6 células/mL)	5.65	8.70	6.07	9.70
Viabilidad de cosecha (%)	41	48	41	41
Titulación de 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 de enzima de cosecha clarificada (U/mL)	2385	1768	1039	1425
Ensayo de enzima concentrada (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Ensayo de enzima de concentrado intercambiado de solución amortiguadora (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Ensayo de enzima de concentrado intercambiado de	21550	10882	9471	8527

solución amortiguadora filtrada (U/mL)				
Volumen de concentrado intercambiado de solución amortiguadora (mL)	10699	13578	12727	20500
Relación de concentración/cosecha de unidades de enzima	0.87	0.96	1.32	1.4

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sefarosa (Pharmacia) (resina de 3 L, Altura = 20 cm, Diámetro = 14 cm). Las muestras de lavado se recolectaron para una determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volumenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7.5. La cosecha diafiltrada, concentrada se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volumenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7.5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.0 y filtró a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril.

Luego se realizó la cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil-Sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sefarosa (PS) (resina de 9.1 L, Altura = 29 cm, Diámetro = 20cm). La columna se equilibró con 5 volumenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH 7.0. El eluido de proteína de arriba se complementó con sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y soluciones madre $CaCl_2$ 1 M para concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 0.1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. El fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y $CaCl_2$ 0.1 mM pH 7.0 se agregó a 100 cm/hr. El flujo pasó a través de un filtro final 0.22 µm en una bolsa estéril.

La proteína purificada PS se cargó en una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics) (resina de 6.3 L, Altura = 20 cm, Diámetro =

20cm) que se ha equilibrado con 5 volumenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M. La proteína se pasó a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 cm/hr, y la columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 7.0. La columna luego se lavó con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9.0 y la proteína eluida con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM pH 6.9 a través de un filtro estéril y en una bolsa estéril de 20 L. El eluido se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de enzima.

Se equilibró una columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (resina de 1.6 L, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm) con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM pH 7.0. Las muestras de lavado se recolectaron y probaron para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL. La proteína purificada de aminofenil boronato se complementó con fosfato de potasio y $CaCl_2$ para proporcionar concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 0.1 mM y cargó en la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, luego fosfato de potasio 10 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM pH. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM pH 7.0 y filtró a través de un filtro 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 5 L. El eluido se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de enzima.

La proteína purificada HAP luego se bombeó a través de un filtro de eliminación vírico 20 nM por medio de un tanque de presión. La proteína se agregó al tanque de presión DV20 y filtró (Pall Corporation), pasando a través de un Filtro Ultipor DV20 con poros 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento de 20 L estéril. El filtrado se probó para concentración de proteína, actividad de enzima, oligosacárido, monosacárido y perfil de ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado luego se concentró hasta 1 mg/mL usando un sistema (Sartorius) de

filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice de recorte de peso molecular (MWCO) 10 kD. El filtro se preparó primero por lavado con una solución de Hepes/salina (Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7.0) y el permeado se probó para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se colocó en muestra y probó para la concentración de proteína y actividad de enzima. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6× en la proteína concentrada en la solución amortiguadora final: Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7.0. La proteína concentrada se pasó a través de un filtro 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se colocó en muestra y probó para la concentración de la proteína, actividad de enzima, grupos sulfidrilo libres, perfil de oligosacárido y osmolaridad.

Las Tablas 20 hasta 26 proporcionan datos de monitoreo relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas arriba, para cada lote de célula 3D35M.

Tabla 20. Datos de la columna Q de sefarosa

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Relación de volumen de carga/volumen de resina	3.1	4.9	4.5	7.3
Volumen de columna (mL)	2770	3840	2850	2880
Volumen eluido (mL)	6108	5923	5759	6284
Concentración de proteína del eluido (mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
Ensayo de la Enzima Eluida (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento de la Enzima (%)	65	107	87	76

Tabla 21. Datos de la columna de Fenil Sefarosa				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen antes de la adición de solución madre (mL)	5670	5015	5694	6251
Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de la columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Relación de volumen de carga/volumen de resina	0.8	0.71	0.82	0.89
Volumen eluido (mL)	16144	18010	16960	17328
Concentración de proteína del eluido (mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
Ensayo de Enzima eluida (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de proteína (%)	41	40	36	37
Rendimiento de Enzima (%)	102	88	82	96

Tabla 22. Datos de la columna de Amino Fenil Boronato				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Relación de volumen de carga/volumen de resina	2.99	3.15	3.08	2.98
Volumen de la columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen eluido (mL)	17595	22084	20686	19145
Concentración de proteína del eluido (mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
Concentración de proteína del eluido filtrado (mg/mL)	no probado	0.03	0.00	0.04
Ensayo de la Enzima eluida (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de la proteína (%)	0	11	11	12
Rendimiento de la (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 23. Datos de la columna de hidroxiapatita				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen antes de la adición de la solución madre (mL)	16345	20799	20640	19103
Relación 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 eluido (mL)	4100	2415	1936	2419
Concentración de proteína del eluido (mg/mL)	no probado	0.24	0.17	0.23
Concentración de proteína del eluido filtrado (mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
Ensayo de Enzima eluida (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de proteína (%)	No probado	93	53	73
Rendimiento de Enzima (%)	87	118	140	104

Tabla 24. Datos de la filtración DV20				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen del filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Concentración de proteína del filtrado (mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
Concentración de proteína del eluido filtrado (mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
Rendimiento de proteína (%)	no probado	93	82	101

Tabla 25. Datos de la concentración final				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	4575	3298	2963	3492
Volumen del concentrado (mL)	562	407	237	316
Concentración de proteína del concentrado (mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
Rendimiento de proteína (%)	111	102	103	98

Tabla 26. Intercambio de solución amortiguadora en los datos de la formulación final				
Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	562	407	237	316
Concentrado intercambiado de Solución amortiguadora de volumen final (mL)	594	516	310	554
Concentración de proteína del concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Concentración de proteína del concentrado filtrado (mg/mL)	0.95	0.92	0.95	1.02
Rendimiento de proteína (%)	118	99	110	101

La proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada se rellenó asépticamente en viales estériles con volúmenes de relleno de 5 mL y 1 mL. La proteína se pasó a través de un filtro de 0.22 µm a una bomba controlada operadora que se usó para rellenar los viales usando un lectura gravimétrica. Los viales se cerraron con tapones y aseguraron con tapas onduladas. Los viales cerrados se inspeccionaron visualmente para particulares exteriores y luego etiquetaron. Después de etiquetarlos, los viales se congelaron en un instante por sumersión en nitrógeno líquido durante ya no más de 1 minuto y almacenaron a ≤-15°C (-20 ± 5°C).

Ejemplo 14

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

La línea celular Gen1 3D35M descrita en el Ejemplo 13 se adaptó a

niveles de metotrexato superiores para producir clones de 2ª generación (Gen2). Las células 3D35M se sembraron de cultivos que contienen metotrexato estabilizados en Medio CD CHO que contiene GlutaMAX-1™ 4mM y 1.0 µM de metotrexato. Las células se adaptaron a un nivel de metotrexato superior al crecer y pasarlos 9 veces durante un periodo de 46 días en un incubado humidificado de CO_2 al 7% a 37°C. La población amplificada de células se clonó al limitar la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contienen medio con 2.0 µM de metotrexato. Después de aproximadamente 4 semanas, los clones se identificaron y el clon 3E10B se seleccionó para expansión. Las células 3E10B se hicieron crecer en Medio CD CHO que contiene GlutaMAX-1™ 4 mM y 2.0 µM de metotrexato durante 20 pasajes. Un banco celular principal (MCB) de la línea celular 3E10B se creó y congeló y usó para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continua al cultivar células 3E10B en Medio CD CHO que contiene GlutaMAX-1™ 4 mM y 4.0 µM de metotrexato. Después del 12° pasaje, las células se congelaron en viales como un banco celular de búsqueda (RCB). Un vial del RCB se descongeló y cultivó en medio que contiene 8.0 µM de metotrexato. Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se incrementó hasta 16.0 µM, luego 20.0 µM 18 días después. Las células del 8° pasaje en medio que contiene 20.0 µM de metotrexato se clonaron al limitar la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contienen Medio CD CHO que contiene GlutaMAX-1™ 4 mM y 20.0 µM de metotrexato. Los clones se identificaron 5-6 semanas después y el clon 2B2 se seleccionó para la expansión en medio que contiene 20.0 µM de metotrexato. Después del 11° pasaje, las células 2B2 se descongelaron en viales como un banco celular de búsqueda (RCB).

Las células 2B2 resultantes son células CHO DG44 deficientes de dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humano recombinantes soluble (rHuPH20). El PH20 soluble está presente en células 2B2 en un

número de copia de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis Southern blot de ADN de célula 2B2 genómica digerida de Spe I-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica rHuPH20 revela el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación mayor de ~7.7 kb y cuatro bandas de hibridación menores (~13.9, ~6.6, ~5.7 y ~4.6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación mayor de ~5.0 kb y dos bandas de hibridación menores (~13.9 y ~6.5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación sencilla de ~1.4 kb observada usando 2B2 ADN digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcrito de mARN indica que el cADN derivado (SEQ ID NO: 139) fue idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 110) excepto por una diferencia en el par base en la posición 1131, que se observó para ser una timidina (T) en lugar de la citosina esperada (C). Esto es una mutación silenciosa, sin efecto en la secuencia de aminoácido.

Ejemplo 15

A. Producción de rHuPH20 soluble Gen2 en Cultivo celular del Bioreactor de 300 L

Un vial de HZ24-2B2 se descongeló y expandió de matraces agitadores a través de matraces centrifugadores de 36L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 20 µM de metotrexato y GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Brevemente, el vial de células se descongeló en un baño de agua a 37°C, el medio se agregó y las células se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio fresco y colocó en un incubador de CO_2 al 7% a 37°C. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz agitador de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanza mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza mayor

que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 250 mL en volumen de cultivo de 200 mL, y el matraz se incubó a CO_2 al 7% a 37°C. Cuando la densidad celular alcanza mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 1 L en volumen de cultivo de 800 mL e incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza mayor que 1.5 x 10^6 células/mL el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 6 L en 5000 mL de volumen de cultivo e incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanza mayor que 1.5 x 10^6 células/mL el cultivo se expandió en un matraz centrifugador de 36 L en 32 L de volumen de cultivo e incubó a 37°C, CO_2 al 7%.

Un reactor de 400 L se esterilizó y se agregó 230 mL de medio CD-CHO. Antes del uso, el reactor se verificó por contaminación. Aproximadamente 30 L de células se transfectaron de los matraces centrifugadores de 36L al bioreactor de 400 L (Braun) en una densidad de inoculación de 4.0 × 10^5 células viables por ml y un volumen total de 260L. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; Velocidad impulsora 40-55 RPM; presión del recipiente: 0.2109 kg/cm^2 (3 psi); Aspersión de aire 0.5- 1.5 L/Min.; Sobrecapa de aire: 3 L/ min. El reactor se probó diariamente para las cuentas celulares, verificación de pH, análisis de medio, producción y retención de la proteína. También, se agregaron durante las alimentaciones de nutriente de corrida. En 120 hrs (día 5), se agregó 10.4L de Medio de alimentación #1 (4× CD-CHO + 33 g/L Glucosa + 160 mL/L Glutamax-1™ + 83 mL/L Yeastolato + 33 mg/L rHuInsulina). En 168 horas (día 7), se agregó 10.8 L de Alimentación #2 (2× CD-CHO + 33 g/L Glucosa + 80 mL/L Glutamax-1™ + 167 mL/L Yeastolato + 0.92 g/L Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambió a 36.5°C. En 216 horas (día 9), se agregó 10.8 L de Alimentación #3 (1× CD-CHO + 50 g/L Glucosa + 50 mL/L Glutamax-1™ + 250 mL/L Yeastolato + 1.80 g/L Butirato de sodio), y la temperatura de cultivo se cambio hasta 36°C. En 264 horas (día 11), se

agregó 10.8 L de Alimentación #4 (1× CD-CHO + 33 g/L Glucosa + 33 mL/L Glutamax-1™ + 250 mL/L Yeastolato + 0.92 g/L Butirato de sodio), y la temperatura decultivo se cambió hasta 35.5°C. La adición del medio de alimentación se observó para potencial dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción. El reactor se cosechó en 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cae debajo del 40%. El proceso resulta en una productividad final de 17,000 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones de células/mL. En cosecha, el cultivo se probó para actividad de enzima y microscopia de electrón de transmisión (TEM), micoplasma, biocarga, endotoxina, y vírica *in vitro* e *in vivo*.

El cultivo se bombeó por una bomba peristáltica a través de cuatro módulos del sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, cada uno contiene una capa de tierra diatomácea graduada hasta 4-8 µm y una capa de tierra diatomácea graduada hasta 1.4-1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak sencillo (Millipore) que contiene una capa de tierra diatomácea graduada hasta 0.4-0.11 µm y una capa de tierra diatomácea graduada hasta <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 de uso sencillo estéril con una capacidad de 350 L. El fluido de cultivo celular cosechado se complementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7.5. El cultivo se concentró 10× con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros (Sartorious) de poliéter sulfona (PES) de 30 kDa corte de peso molecular (MWCO) Sartoslice TFF, seguido por un intercambio de solución amortiguadora 10× con Tris 10 mM, Na_2SO_4 20mM, pH 7.5 en un filtro final 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

La cosecha diafiltrada, concentrada se inactivó por virus. Antes de la inactivación vírica, una solución de Triton® X-100 al 10%, fosfato de tri (n-butilo) (TNBP) al 3% se preparó. La cosecha

diafiltrada, concentrada se expuso a Triton® X-100 al 1%, TNBP al 0.3% durante 1 hora en un recipiente de reacción de vidrio de 36 L inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

B. Purificación de rHuPH20 soluble Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico de Q Sefarosa (Pharmacia) (resina de 9 L, H= 29 cm, D= 20 cm). Las muestras de lavado se recolectaron para una determinación de pH, conductividad y ensayo endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volumenes de columna de Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7.5. Después de la inactivación vírica, la cosecha diafiltrada, concentrada se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7.5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH7.0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de hialuronidasa. Las lecturas de absorbancia A_{280} se tomaron al inicio y final del intercambio.

Luego se realizó la cromatografía de interacción hidrofóbica de Fenil-Sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de Fenil-Sefarosa (PS) (19-21 L de resina, H=29 cm, D= 30 cm). El lavado se recolectó y colocó en muestra para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, CaCl2 0.1 mM, pH 7.0. La proteína eluida de la columna de Q sefarosa se complementó con soluciones madre de sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y $CaCl_2$ 1 M para proporcionar concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M and 0.1 mM, respectivamente. La proteína se cargó en la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr y el flujo de columna recolectado. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y CaCl2 0.1 mM pH 7.0 en 100 cm/hr y el lavado se agregó al flujo recolectado. El

combinado con el lavado de columna, el flujo pasa a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. El flujo se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de enzima.

Se preparó una columna de aminofenil boronato (Prometics). El lavado se recolectó y colocó en muestra para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M. El flujo a través de PS que contiene la proteína purificada se cargó en la columna de aminofenil boronato a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 7.0. La columna se lavó con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 9.0. La columna se lavó con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9.0. La proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6.9 y se pasó a través de un filtro estéril en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de enzima.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recolectó y probó para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH 7.0. La proteína purificada de aminofenil boronato se complementó para concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 0.1 mM y cargó en la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM. La columna se lavó después con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0 y se pasó a través de un filtro estéril de 0.22µm en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteína y actividad de enzima.

La proteína purificada de HAP luego se pasó a través de un filtro de elimnación vírica. El filtro Viosart esterilizado (Sartorius) se preparó primero al lavar con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0.

Antes del uso, la solución amortiguadora filtrada se probó para pH y conductividad. La proteína purificada de HAP se bombeó por medio de una bomba peristáltica a través del filtro de eliminación vírica 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0 se pasó a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra filtrada vírica se probó para la concentración de la proteína, actividad de enzima, perfil de oligosacárido, monosacárido y ácido siálico. La muestra también se probó para impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado luego se concentró hasta 10 mg/mL usando un sistema (Sartorius) de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice de 10 kD de corte de peso molecular (MWCO). El filtro se preparó primero por lavado con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0 y el permeado se probó para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se colocó en muestra y probó para la concentración de proteína y actividad de enzima. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6× en la proteína concentrada en la solución amortiguadora final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0. Después del intercambio de la solución amortiguadora, la proteína concentrada se pasó a través de un filtro 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se colocó en muestra y probó para la concentración de la proteína, actividad de enzima, grupos sulfhidrilo libres, perfil de oligosacárido y osmolaridad.

La proteína de volumen filtrada estéril luego se dispensó asépticamente en 20 mL en viales de Teflon estériles de 30 mL (Nalgene). Los viales luego se congelaron al instante y almacenaron a -20 ± 5°C.

C. Comparación de producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen1 y rHuPH20 soluble Gen2

La producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen2 en un

cultivo celular del bioreactor de 300L que contiene algunos cambios en los protocolos comparados con la producción y purificación rHuPH20 soluble Gen1 en un cultivo celular de bioreactor de 100L (descrito en el Ejemplo 13B). La Tabla 27 establece diferencias ejemplares, además de cambios en escala sencillos, entre los métodos.

Tabla 27.		
Diferencia del proceso	**rHuPH20 soluble Gen1**	**rHuPH20 soluble Gen2**
Línea celular	3D35M	2B2
Medio usado para expandir el inóculo celular	Contiene 0.10 µM de metotrexato (0.045 mg/L)	Contiene 20 µM de metotrexato (9 mg/L)
Medio en cultivos de 6L hacia adelante	Contiene 0.10 µM de metotrexato	No contiene metotrexato
Matraz centrifugador de 36 L	Sin instrumento 20 L de volumen de operación.	Equipado con instrumentos que vigilan y controlan el pH, velocidad de flujo del gas de sobrecapa y de aspersión, de oxígeno disuelto, 32 L de volumen de operación
Volumen de operación final en el bioreactor	Aprox. 100 L en un bioreactor de 125 L (volumen inicial de cultivo + 65 L)	Aprox. 300L en un bioreactor de 400L (volumen inicial de cultivo + 260L)
Medio de cultivo en el bioreactor final	Sin rHuInsulina	5.0 mg/L rHuInsulina
Medio de volumen de alimentación	Escala en 4% del volumen de cultivo celular del bioreactor es decir 3.4, 3.5 y 3.7 L, resultando en un volumen del bioreactor objetivo de ~92 L.	Escala en 4% del volumen de cultivo celular del bioreactor es decir 10.4, 10.8, 11.2 y 11.7 L, resultando en un volumen del bioreactor objetivo de ~303L.
Medio de alimentación	Medio de Alimentación #1: CD	Medio de Alimentación #1: 4× CD CHO + 33

	CHO + 50 g/L Glucosa + GlutaMAX™-1 8mM Alimentación #2 (CD CHO + 50 g/L Glucosa + GlutaMAX 8 mM + 1.1 g/L Butirato de sodio Alimentación #3: CD CHO + 50 g/L Glucosa + GlutaMAX 8 mM + 1.1 g/L Butirato de sodio	g/L Glucosa + Glutamax 32 mM + 16.6 g/L Yeastolato + 33 mg/L rHuInsulina Alimentación #2: 2× CD CHO + 33 g/L Glucosa + Glutamax 16 mM + 33.4 g/L Yeastolato + 0.92 g/L Butirato de sodio Alimentación #3: 1× CD CHO + 50 g/L Glucosa + Glutamax 10 mM + 50 g/L Yeastolato + 1.80 g/L Butirato de sodio Alimentación #4:1× CD CHO + 33 g/L Glucosa + Glutamax 6.6 mM + 50 g/L Yeastolato + 0.92 g/L Butirato de sodio
Filtración del cultivo celular del bioreactor	Cuatro filtros de poliétersulfona (8.0 µm, 0.65 µm, 0.22 µm y 0.22 µm) en serie	1ª etapa - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra diatomácea graduada hasta 4-8 µm y una capa de tierra diatomácea graduada hasta 1.4-1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª etapa - módulo sencillo que contiene una capa de tierra diatomácea graduada hasta 0.4-0.11 µm y

	Bolsa de almacenamiento de 100 L	una capa de tierra diatomácea graduada hasta <0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 3ª etapa - filtro de poliétersulfona de 0.22 µm Bolsa de almacenamiento de 300L Cultivo celular cosechado está complementado con EDTA 10 mM, Tris 10 mM hasta un pH de 7.5.
Concentración e intercambio de solución amortiguadora antes de la cromatografía	Concentrado con 2 TFF con Filtro 30K MWCO de Poliétersulfona Millipore Spiral La solución amortiguadora intercambia el concentrado 6× con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7.0 Bolsa de almacenamiento estéril de 20L	Concentrado usando cuatro Filtros Sartorius Sartoslice TFF 30K MWCO Solución amortiguadora intercambia el concentrado 10× con 10 mM Tris, 20 mM Na2SO4, pH 7.5 Bolsa de almacenamiento estéril de 50L
Inactivación vírica antes de la cromatografía	Ninguno	Inactivación vírica realizada con la adición de un Triton® X-100 al 1%, Fosfato de Tributilo al 0.3%,

		pH 7.5,
1ª etapa de purificación (Q sefarosa)	Sin lectura de absorbancia	Mediciones A280 al inicio y final
Filtración vírica después de la cromatografía	Filtro DV-20 de paño (20 nm)	Filtro Sartorius Virosart (20 nm)
Concentración e intercambio de solución amortiguadora después de la cromatografía	Solución amortiguadora de pH 7.0 Hepes/salina Proteína concentrada hasta 1 mg/ml	Solución amortiguadora de pH 6.0 Histidina/salina Proteína concentrada hasta 10 mg/ml

Ejemplo 16

Determinación del contenido de ácido siálico y monosacárico

El contenido de ácido siálico y monosacárido de rHuPH20 soluble puede evaluarse por cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) seguida por hidrólisis con ácido trifluoroacético. En un ejemplo, se determinó el contenido de ácido siálico y monosacárido de hialuronidasa purificada lote # HUB0701E (1.2 mg/mL; producido y purificado esencialmente como se describe en el Ejemplo 15). Brevemente, 100 µg de muestra se hidrolizó con ácido trifluoroacético al 40% (v/v) a 100°C durante 4 horas en duplicados. Después de la hidrólisis, las muestras se secaron completamente y volvieron a suspender en 300 µL de agua. Una alícuota de 45 µL de cada muestra re-suspendida se transfirió a un tubo nuevo y se secó completamente, y se agregó a cada una 10 µL de una solución de acetato de sodio 10 mg/mL. Los monosacáridos liberados se etiquetaron fluorescentemente por la adición de 50 µL de una solución que contiene 30 mg/mL de ácido 2-aminobenzoico, 20 mg/mL de cianoborohidruro de sodio, aproximadamente 40 mg/mL de acetato de sodio y 20 mg/mL de ácido bórico en metanol. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 80°C en la oscuridad. La reacción de derivatización se apagó por la adición de 440 µL de fase móvil A (n-butilamina al 0.2% (v/v), ácido fosfórico al 0.5% (v/v), tetrahidrofurano al 1% (v/v)). Un vacío de la matriz de agua también se hidrolizó y derivó como se describe para la muestra de hialuronidasa como un control negativo. Los monosacáridos liberados se separaron por RPLC usando una columna de fase inversa de Octadecilo (C_{18}) (4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula; J.T. Baker) y vigiló por detección de fluorescencia (360 nm de excitación, 425 nm de emisión). La cuantificación del contenido de monosacárido se hizo por comparación de los cromatogramas de la

muestra de hialuronidasa con cromatogramas de estándares de monosacárido incluyendo *N*-D-glucosamina (GlcN), *N*-D-galactosamina (GalN), galactosa, fucosa y manosa. La Tabla 28 presenta la relación molar de cada monosacárido por molécula de hialuronidasa.

Tabla 28. Contenido de monosacárido de rHuPH20 soluble

Lote	Replicado	GlcN	GalN	Galactosa	Manosa	Fucosa
HUB0701E	1	14.28	0.07*	6.19	25.28	2.69
	2	13.66	0.08*	6.00	24.34	2.61
	Promedio	13.97	0.08*	6.10	24.81	2.65

* Los resultados GalN fueron debajo del límite de detección

Ejemplo 17

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

Se realizó procesamiento por secuencia de terminal C en dos lotes de sHuPH20 producidos y purificados de células 3D35M en un volumen de bioreactor de 100 L (Lote HUA0505MA) y células 2B2 en un volumen de bioreactor de 300L (Lote HUB0701EB). Los lotes se digirieron separadamente con endoproteinasa Asp-N, que escinden específicamente enlaces de péptido de terminal N en ácido aspártico y cisteico. Esto libera la porción de terminal C del rHuPH20 soluble en el ácido aspártico en la posición 431 de la SEQ ID NO: 122. Los fragmentos de terminal C se separaron y caracterizaron para determinar la secuencia y abundancia de cada población en el Lote HUA0505MA y Lote HUB0701EB.

Se observó que las preparaciones de rHuPH20 soluble de células 3D35M y células 2B2 muestran heterogeneidad, y contienen polipéptidos que difieren uno del otro en su secuencia de terminal C (Tablas 30 y 31). Esta heterogeneidad es probable el resultado de la escisión de terminal C del polipéptido de aminoácido 447 expresado (SEQ ID NO: 122) por peptidasas presentes en el medio de cultivo celular u otras soluciones durante el proceso de producción y purificación. Los polipéptidos en las preparaciones de rHuPH20 soluble tienen secuencias

de aminoácido correspondientes a los aminoácidos 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 y 1-443 de la secuencia de rHuPH20 soluble establecida en la SEQ ID NO: 122. La secuencia de aminoácido completa de cada uno de estos polipéptidos se establece en la SEQ ID NOS: 122 hasta 126, respectivamente. Como se señala en las tablas 29 y 30, la abundancia difiere de cada polipéptido en las preparaciones de rHuPH20 soluble de células 3D35M y células 2B2.

Tabla 29. Análisis de fragmentos de terminal C de Lote HUA0505MA

Fragmento	**Posición de aminoácido (relativa a la SEQ ID NO: 122)**	**Secuencia**	**Masa Teor.**	**Masa Exp.**	**Error**	**Tiempo de elución**	**Abundancia**
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:191)	2053.97	2054.42	0.45	99.87	0.2%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:192)	1890.91	1891.28	0.37	97.02	18.4%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:193)	1743.84	1744.17	0.33	86.4	11.8%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:194)	1630.70	1631.07	0.32	74.15	56.1%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502.70	1502.98	0.28	77.36	13.6%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405.64	ND	N/A	N/A	0.0%

Tabla 30. Análisis de fragmentos de terminal C del Lote HUB0701EB

Fragmento	**Posición de aminoácido (relativa a la SEQ ID NO: 122)**	**Secuencia**	**Masa Teor.**	**Masa Exp.**	**Error**	**Tiempo de elución**	**Abundancia**
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:191)	2053.97	2054.42	0.45	99.89	1.9%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:192)	1890.91	1891.36	0.45	96.92	46.7%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:193)	1743.84	1744.24	0.40	85.98	16.7%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:194)	1630.70	1631.14	0.39	73.9	27.8%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502.70	1503.03	0.33	77.02	6.9%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405.64	ND	N/A	N/A	0.0%

Ya que las modificaciones serán aparentes para aquellos de experiencia en esta técnica, se pretende que esta invención se limite sólo por el alcance de las reivindicaciones anexas.

P-4213
Rvs divisional
Recurso
Marzo 11, 2014

REIVINDICACIONES

1. Una hialuronidasa PH20 truncada que es una hialuronidasa PH20 soluble extendida (esPH20) que consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos definida como residuos 36-491, 36-492, 36-493, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 o 36-500 de la SEQ ID NO: 107.

2. Un polipéptido de hialuronidasa PH20 truncada, que consiste de la secuencia de residuos de aminoácidos definida como residuos de aminoácidos 36-465, 36-484, 36-486, 36-487, 36-488 o 36-489 de la SEQ ID NO: 107.

3. La hialuronidasa PH20 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que es N-glicosilada, en donde:

el polipéptido parcialmente N-glicosilado comprende una porción N-acetilglucosamina vinculada a cada uno de los tres residuos (N) de asparagina; y

los tres residuos de asparagina son los residuos de aminoácidos 235, 368 y 393 de la SEQ ID NO: 107.

4. La hialuronidasa PH20 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se modifica por un polímero, en donde el polímero es dextrano o PEG.

5. La hialuronidasa PH20 de la reivindicación 4, en donde el polímero es un reactivo de PEG, y el PEG es un metoxipolietilenglicol (mPEG).

6. La hialuronidasa PH20 de la reivindicación 4 o la

227

reivindicación 5, en donde el polímero o PEG tiene un peso molecular en el rango de 3 kDa a 60 kDa.

7. La hialuronidasa PH20 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que es sustancialmente purificada o aislada.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica la hialuronidasa PH20 de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la molécula de ácido nucleico no codifica un PH20 de longitud completa sino que codifica un polipéptido PH20 truncado.

9. Un vector de expresión, que comprende polinucleótido que consiste de la secuencia de nucleótidos que codifican una hialuronidasa PH20 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, cada una incluye o inmediatamente seguida por un codón de detención insertado operativamente en el vector para la expresión del polipéptido PH20 truncado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

10. Una célula mamífera, que comprende un vector de la reivindicación 9 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7, en donde la célula mamífera se selecciona de entre células CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB.

11. La célula de la reivindicación 10 que es una célula CHO.

12. Una composición, que comprende un polipéptido de hialuronidasa PH20 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una cantidad que es 10 Unidades a 500.000 Unidades.

13. La composición de la reivindicación 12, en donde el volumen de la composición es 0.1 mL a 100 mL.

14. La composición de la reivindicación 12 o reivindicación 13, en donde el polipéptido PH20 se codifica por una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o un vector de la reivindicación 7.

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el polipéptido PH20 es secretado a partir de células CHO.

16. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que es una composición farmacéutica.

17. Una composición de la reivindicación 16, que comprende un agente terapéutico adicional para administración de dosis simple en una cantidad que es una proporción de la hialuronidasa soluble a agente terapéutico de 1:1 a 50:1.

18. La composición de la reivindicación 17, en donde el agente terapéutico se selecciona de entre Acivicinas; Aclarubicinas; Acodazoles; Acroninas; Adozelesinas; Aldesleucinas; Alemtuzumabs; Alitretinoinas (ácidos 9-Cis-Retinoico); Alopurinoles; Altretaminas; Alvocidibs; Ambazonas; Ambomicinas; Ametantronas; Amifostinas; Aminoglutetimidas; Amsacrinas; Anastrozoles; Anaxirones; Ancitabinas; Antramicinas; Apaziquonas; Argimesnas; Trióxidos de arsénico; Asparaginasas; Asperlinas; Atrimustinas; Azacitidinas; Azetepas; Azotomicinas; Banoxantronas; Batabulinas; Batimastats; BCG Vivo; Benaxibinas; Bendamustinas; Benzodepas;

Bexarotenos; Bevacizumab; Bicalutamidas; Bietaserpinas; Biricodars; Bisantrenos; Bisantrenos; Dimesilatos de Bisnafida; Bizelesinas; Bleomicinas; Bortezomibs; Brequinaros; Bropiriminas; Budotitanos; Busulfanos; Cactinomicinas; Calusteronas; Canertinibas; Capecitabinas; Caracemidas; Carbetimeros; Carboplatinas; Carboquonas; Carmofurs; Carmustinas con Polifeprosanos; Carmustinas; Carubicinas; Carzelesinas; Cedefingoles; Celecoxibs; Cemadotinas; Clorambucilos; Cioteronelos; Cirolemicinas; Cisplatinas; Cladribinas; Clanfenuros; Clofarabinas; Crisnatoles; Ciclofosfamidas; Citarabina liposomales; Citarabinas; Dacarbazinas; Dactinomicinas; Darbepoetinas Alfa; Daunorubicinas liposomales; Daunorubicinas/Daunomicinas; Daunorubicinas; Decitabinas; Denileucina Diftitoxos; Dexniguldipinas; Dexonaplatinas; Dexrazoxanas; Dezaguaninas; Diaziquonas; Dibrospidiums; Dienogests; Dinalinas; Disermolidas; Docetaxeles; Dofequidaros; Doxifluridinas; Doxorubicinas liposomales; Doxorubicina HCL; Docorubicina HCL liposoma de inyección; Doxorubicinas; Droloxifenos; Dromostanolon Propionatos; Duazomicinas; Ecomustinas; Edatrexatos; Edotecarinas; Eflornitinas; Elacridaros; Elinafidas; Soluciones B de Elliott; Elsamitrucinas; Emitefuros; Enloplatinas; Enpromatos; Enzastaurinas; Epipropidinas; Epirubicinas; alfas Epoetina; Eptaloprostos; Erbulozoles; Esorubicinas; Estramustinas; Etanidazoles; Etoglucidas; fosfatos Etopósidos; VP-16s Etopósidos; Etopósido; Etoprinas; Exemestanos; Exisulindas; Fadrozolas; Fazarabinas; Fenretinidas; Filgrastimas; Floxuridinas; Fludarabinas; Fluorouracilos; 5-fluorouracilos; Fluoximesteronas; Flurocitabinas; Fosquidonas; Fostriecinas; Fotretaminas; Fulvestrantos; Galarubicinas; Galocitabinas; Gemcitabinas; Gemtuzumabs/Ozogamicinas; Geroquinoles; Gimatecanos;

Gimeracilos; Gloxazonas; Glufosfamidas; acetatos de Goserelina; Hidroxiureas; Ibritumomabs/Tiuxetanos; Idarubicinas; Ifosfamidas; Ilmofosinas; Ilomastatos; Imatinib mesilatos; Imexonas; Improsulfanos; Indisulamos; Inproquonas; Interferones alfa-2as; Interferones alfa-2bs; Interferones alfa; Interferones beta; Interferones gamma; Interferones; Interleucinas-2 y otras Interleucinas (incluyendo Interleucinas recombinante); Intoplicinas; Iobenguanos [131-I]; Iproplatinas; Irinotecanos; Irsogladinas; Ixabepilonas; Cetotrexatos; L-Alanosinas; Lanreotidas; Lapatinibs; Ledoxantronas; Letrozoles; Leucovorinas; Leuprorelinas (Leuprolidas); Levamisoles; Lexacalcitoles; Liarozoles; Lobaplatinas; Lometrexoles; Lomustinas/CCNUs; Lonafarnibas; Losoxantrones; Lurtotecanos; Mafosfamidas; Mannosulfanos; Marimastatos; Masoprocolos; Maitansinas; Mecloretaminas; Mecloretaminas/Mostazas de Nitrógrno; acetatos de Megestrol; Megestroles; Melengestroles; Melfalanos; Menogarilos; Mepitiostanos; Mercaptopurinas; Mesnas; Metesindas; Metotrexatos; Metoxsalenos; Metomidatos; Metoprinas; Meturedepas; Miboplatinas; Miproxifenos; Misonidazoles; Mitindomidas; Mitocarcinas; Mitocrominas; Mitoflaxonas; Mitogilinas; Mitoguazonas; Mitomalcinas; Mitomicinas C; Mitomicinas; Mitonafidas; Mitoquidonas; Mitospers; Mitotanos; Mitoxantronas; Mitozolomidas; Mivobulinas; Mizoribinas; Mofarotenos; Mopidamoles; Mubritinibas; Ácidos Micofenólicos; fenpropionatos de Nandrolona; Nedaplatinas; Nelzarabinas; Nemorubicinas; Nitracrinas; Nocodazoles; Nofetumomabs; Nogalamicinas; Nolatrexeds; Nortopixantronas; Octreotidos; Oprelvecinas; Ormaplatinas; Ortataxeles; Oteracilos; Oxaliplatinas; Oxisuranos; Oxofenarsinas; Paclitaxeles; Pamidronatos; Patubilonas; Pegademasas; Pegaspargasas; Pegfilgrastimas; Peldesinas; Peliomicinas; Pelitrexoles;

Pemetrexedos; Pentamustinas; Pentostatinas; Peplomicinas; Perfosfamidas; Perifosinas; Picoplatinas; Pinafidas; Pipobromanos; Piposulfanos; Pirfenidonas; Piroxantronas; Pixantronas; Plevitrexedos; Mitramicinas; Plicamicinas; Plomestanos; Plomestanos; sodios de Porfímeros; Porfímeros; Porfiromicinas; Prednimustinas; Procarbazinas; Propamidinas; Prospidiumos; Pumitepas; Puromicinas; Pirazofurinas; Quinacrinas; Ranimustinas; Rasburicasos; Riboprinas; Ritrosulfanos; Rituximabs; Rogletimidas; Roquinimexos; Sabarubicinas; Safingoles; Sargramostimos; Satraplatinas; Sebriplatinas; Semustinas; Simtrazenos; Sizofiranos; Sobuzoxanos; Sorafenibas; Esparfosatos; Ácidos Sparfósicos; Esparsomicinas; Espirogermanos; Espiromustinas; Espiroplatinas; Espiroplatinas; Escualaminas; Estreptonigrinas; Estreptovaricinas; Estreptozocinas; Sufosfamidas; Sulofenuros; Sunitinib Malato; Tacedinalinas; Talcos; Talisomicinas; Talimustinas; Tamoxifenos; Tariquidaros; Tauromustinas; Tecogalanos; Tegafuros; Teloxantronas; Temoporfinas; Temozolomidas; Tenipósidos/VM-26s; Tenipósidos; Teroxironas; Testolactonas; Tiamiprinas; Tioguaninas; Tiotepas; Tiamiprinas; Tiazofurinas; Tilomisoles; Tilorones; Timcodars; Timonacicos; Tirapazaminas; Topixantronas; Topotecanos; Toremifenos; Tositumomabs; Trabectedinas (Ecteinascidina 743); Trastuzumabs; Trestolonas; Tretinoinas/ATRA; Triciribinas; Trilostanos; Trimetrexatos; Tetranitratos de triplatina; Triptorelinas; Trofosfamidas; Tubulozolas; Ubenimexs; mostazas de Uracilo; Uredepas; Valrubicinas; Valspodaros; Vapreotidas; Verteporfinas; Vinblastinas; Vincristinas; Vindesinas; Vinepidinas; Vinfluninas; Vinformidas; Vinglicinatos; Vinleucinoles; Vinleurosinas; Vinorelbinas; Vinrosidinas; Vintriptoles; Vinzolidinas; Vorozoles; Xantomicinas A (Guameciclinas); Zeniplatinas; Zilascorbs [2-H];

Zinostatinas; Zoledronato; Zorubicinas; y Zosuquidaros.

19. La composición de la reivindicación 17, en donde el agente terapéutico se selecciona de entre un anticuerpo, una inmunoglobulina, un bisfosfonato, una citoquina, un agente quimioterapéutico y una insulina.

20. La composición de la reivindicación 19, en donde la insulina es una insulina de acción rápida y el bisfosfonato es ácido zoledrónico.


Humano PH20 MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
Chimpancé PH20 MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
Humano PH20 LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
Chimpancé PH20 LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
Humano PH20 QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
Chimpancé PH20 QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
Humano PH20 LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
Chimpancé PH20 LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
Humano PH20 VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV 300
Chimpancé PH20 VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPV 300
Humano PH20 FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
Chimpancé PH20 FVYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
Humano PH20 ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
Chimpancé PH20 ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
Humano PH20 PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI 480
Chimpacé PH20 PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQI 480
Humano PH20 FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISSVASL 509
Chimpancé PH20 FYNASPSTLSATMFIDLCDLYLVPTSYLIL 510

FIG. 1

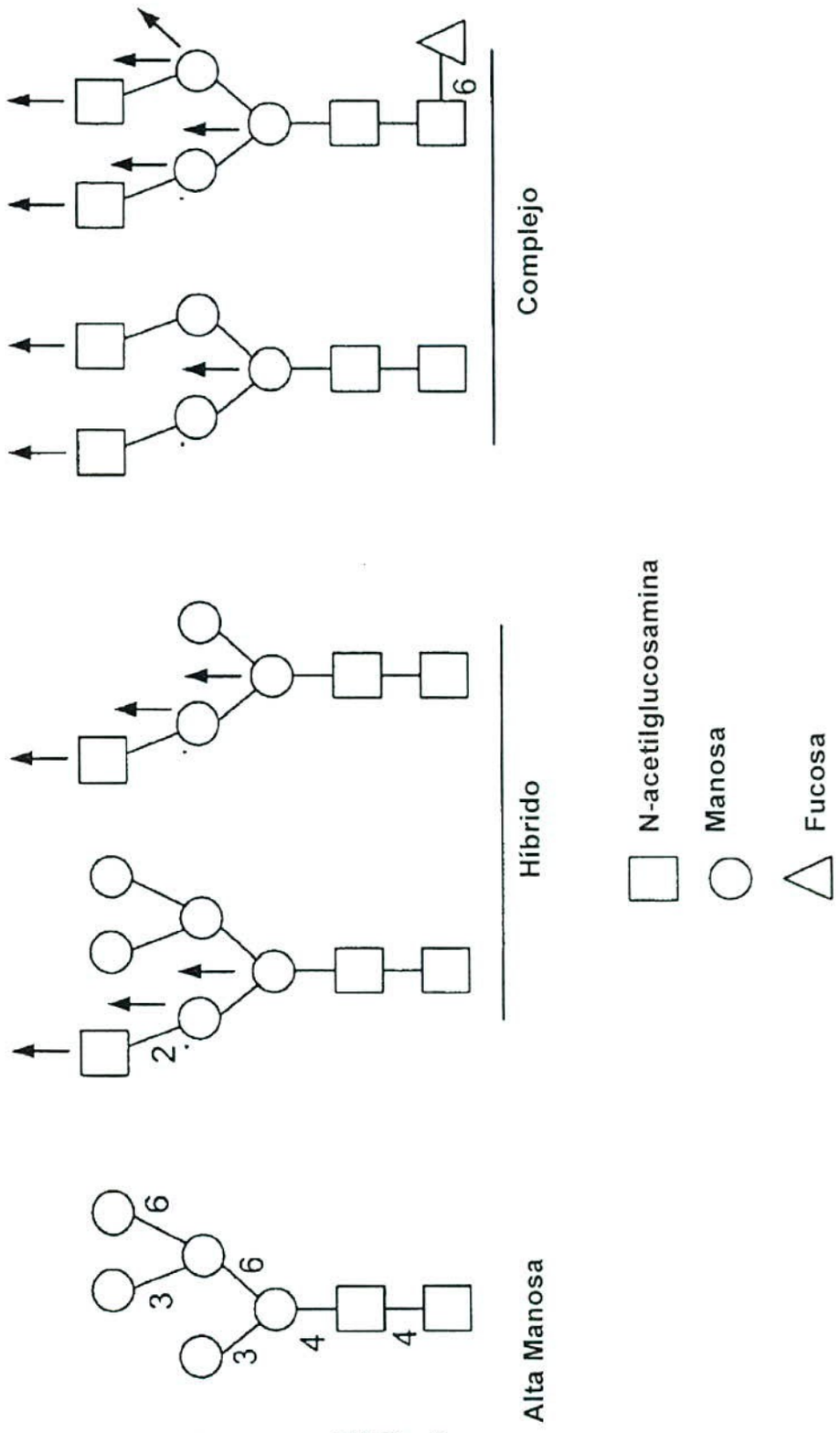
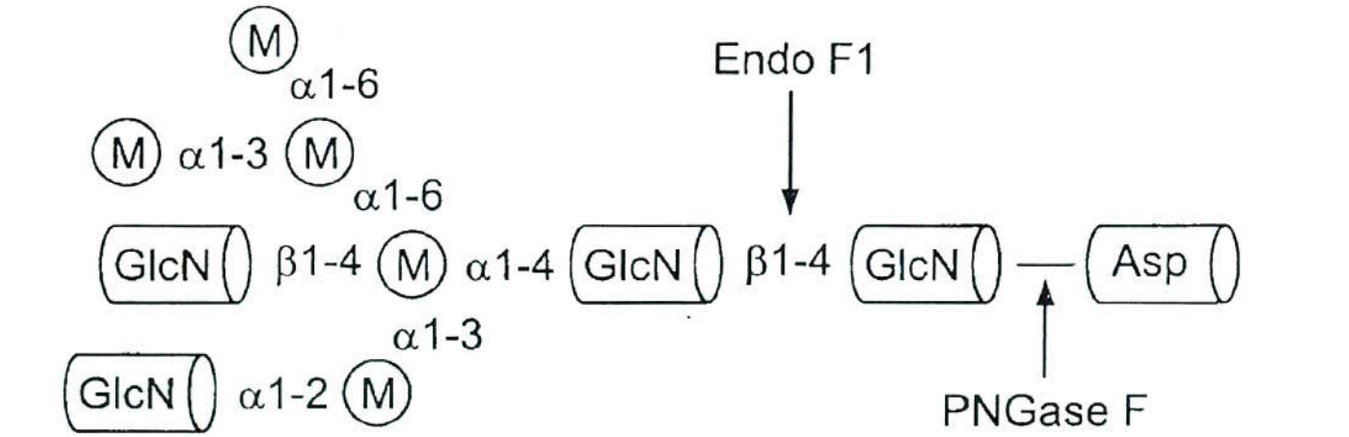
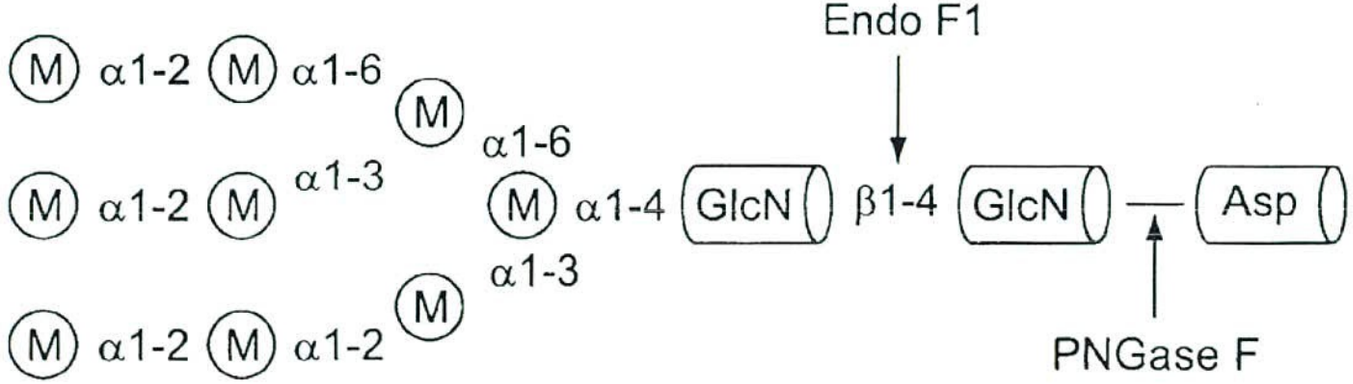

Alta Manosa
Híbrido
Complejo
N-acetilglucosamina
Manosa
Fucosa
2
3
3
4
4
6
6
6

FIG. 2



Oligosacárido (Asp) híbrido ligado en N



Oligosacárido híbrido ligado en N

FIG. 3A

Endo F2
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
α1-6
M
β1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
α1-3
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
PNGase F
Glicano ligado en N biantenario
Endo F2
M
α1-2
M
α1-6
M
α1-6
α1-3
M
α1-2
M
M
α1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
α1-3
M
M
α1-2
M
α1-2
PNGase F
Glicano ligado en N a oligomanosa

FIG. 3B

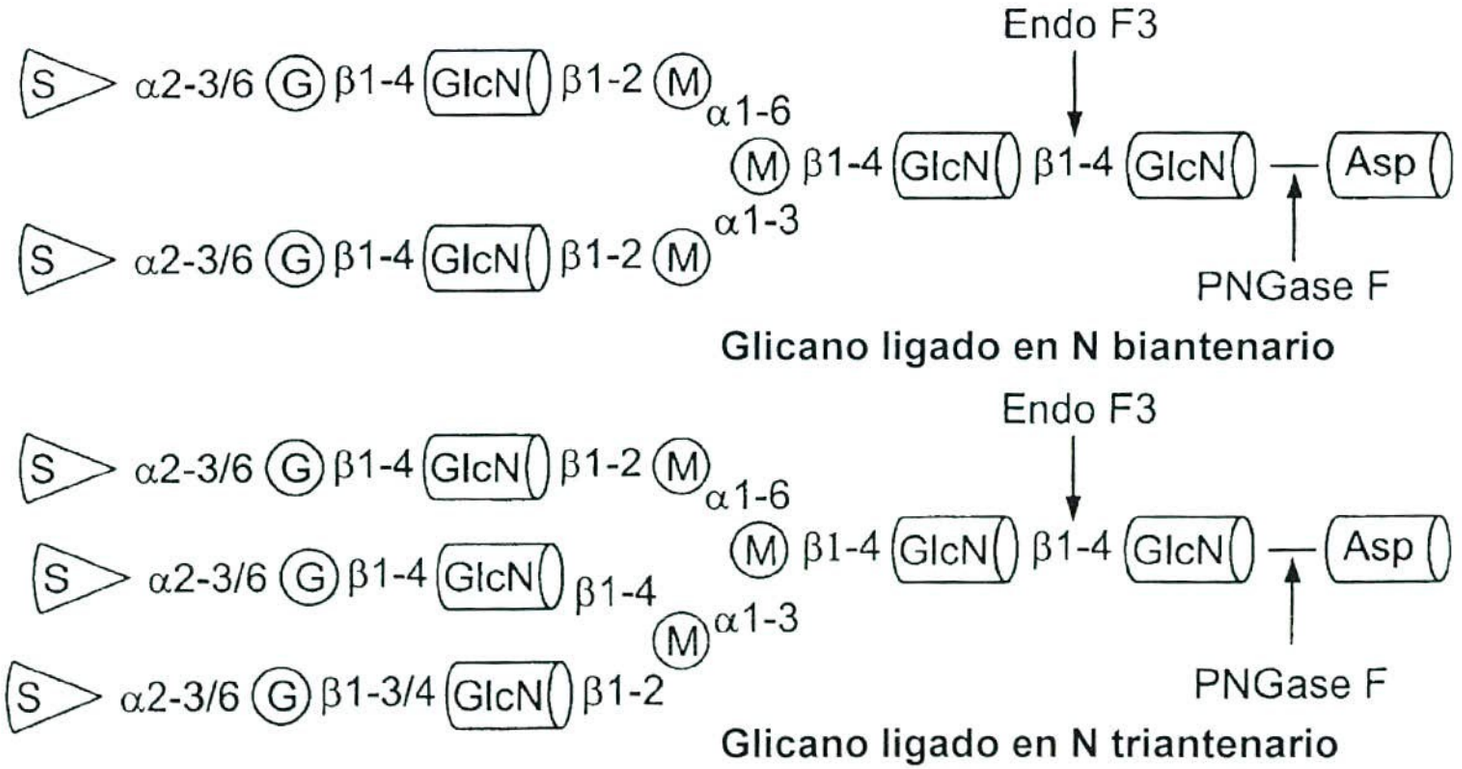

Endo F3
S α2-3/6 G β1-4 GlcN β1-2 M α1-6
M β1-4 GlcN β1-4 GlcN — Asp
S α2-3/6 G β1-4 GlcN β1-2 M α1-3
PNGase F
Glicano ligado en N biantenario
Endo F3
S α2-3/6 G β1-4 GlcN β1-2 M α1-6
S α2-3/6 G β1-4 GlcN β1-4
M α1-3
M β1-4 GlcN β1-4 GlcN — Asp
S α2-3/6 G β1-3/4 GlcN β1-2
PNGase F
Glicano ligado en N triantenario

FIG. 3C

238

M
α1-6
M
α1-3
M
α1-6
GlcN
β1-4
M
α1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
α1-3
GlcN
β1-2
M
Endo H
Hibrído
PNGasa F
M
α1-6
M
α1-6
M
α1-3
M
α1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
α1-3
M
Endo H
Oligomanosa
PNGasa F

FIG. 3D

240

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
2020	2014 3 11	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-51831-	0	7
2	11-85406-	5	7
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones:

EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 2 ARCHIVOS:

1 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.

EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO 240

241

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0018313

Bogotá D.C., Febrero 17 de 2014 - 15:04:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	16982	12/02/2014		4.640.000.00
RECIBO DE CA	999999999	16983	12/02/2014		2.780.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-051831- -00000-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085406- -00005-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 242

241

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0025197

Bogotá D.C., Marzo 06 de 2014 - 10:34:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	25187	06/03/2014		7.002.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
10	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	310.000.00
				$310.000.00

SON: **TRESCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-051831- -00000-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-085406- -00005-0000
Fecha: 2014-03-11 15:33:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 242

242

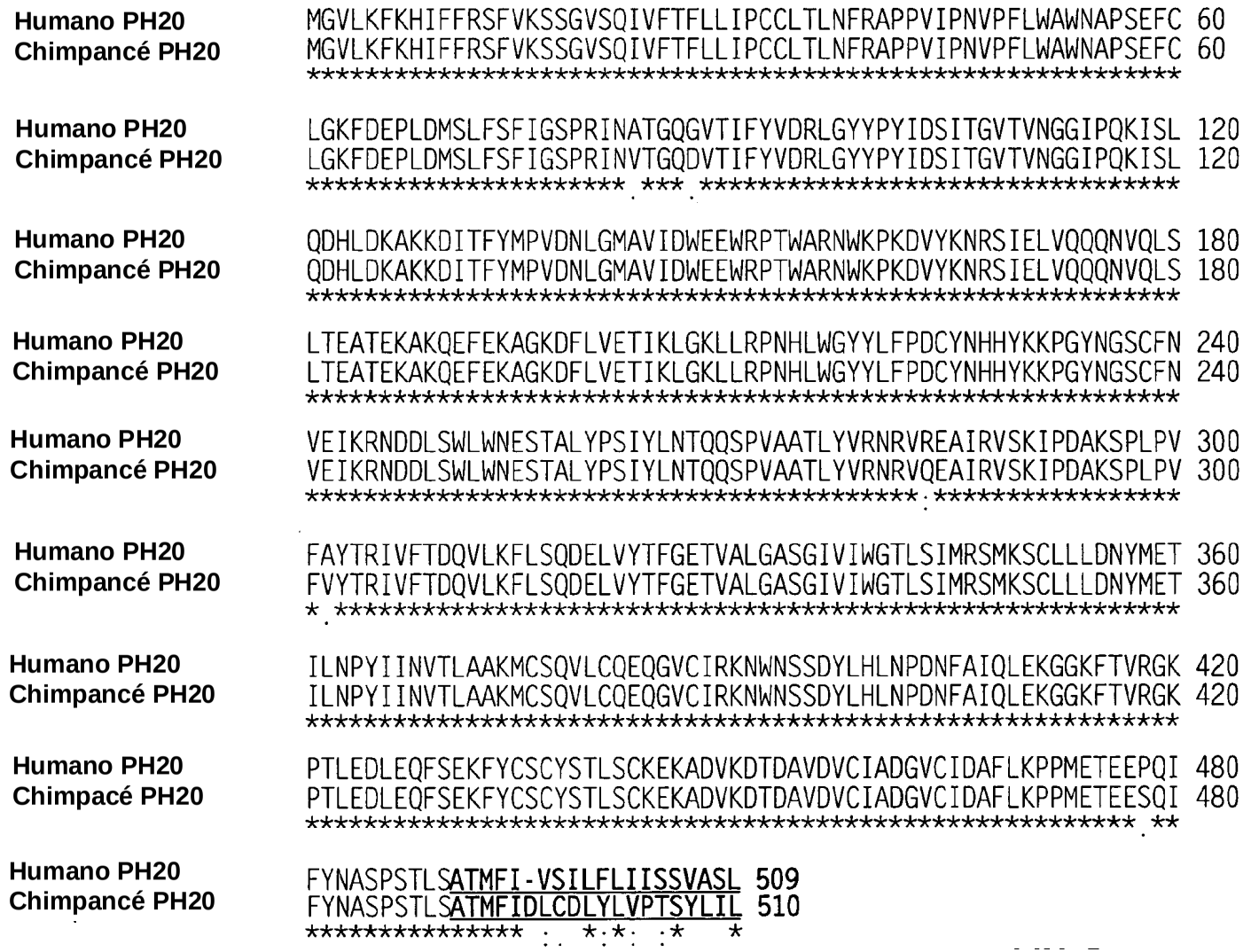

Humano PH20 MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
Chimpancé PH20 MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
Humano PH20 LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
Chimpancé PH20 LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
Humano PH20 QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
Chimpancé PH20 QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
Humano PH20 LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
Chimpancé PH20 LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
Humano PH20 VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV 300
Chimpancé PH20 VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPV 300
Humano PH20 FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
Chimpancé PH20 FVYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
Humano PH20 ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
Chimpancé PH20 ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
Humano PH20 PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI 480
Chimpacé PH20 PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQI 480
Humano PH20 FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISSVASL 509
Chimpancé PH20 FYNASPSTLSATMFIDLCDLYLVPTSYLIL 510

FIG. 1

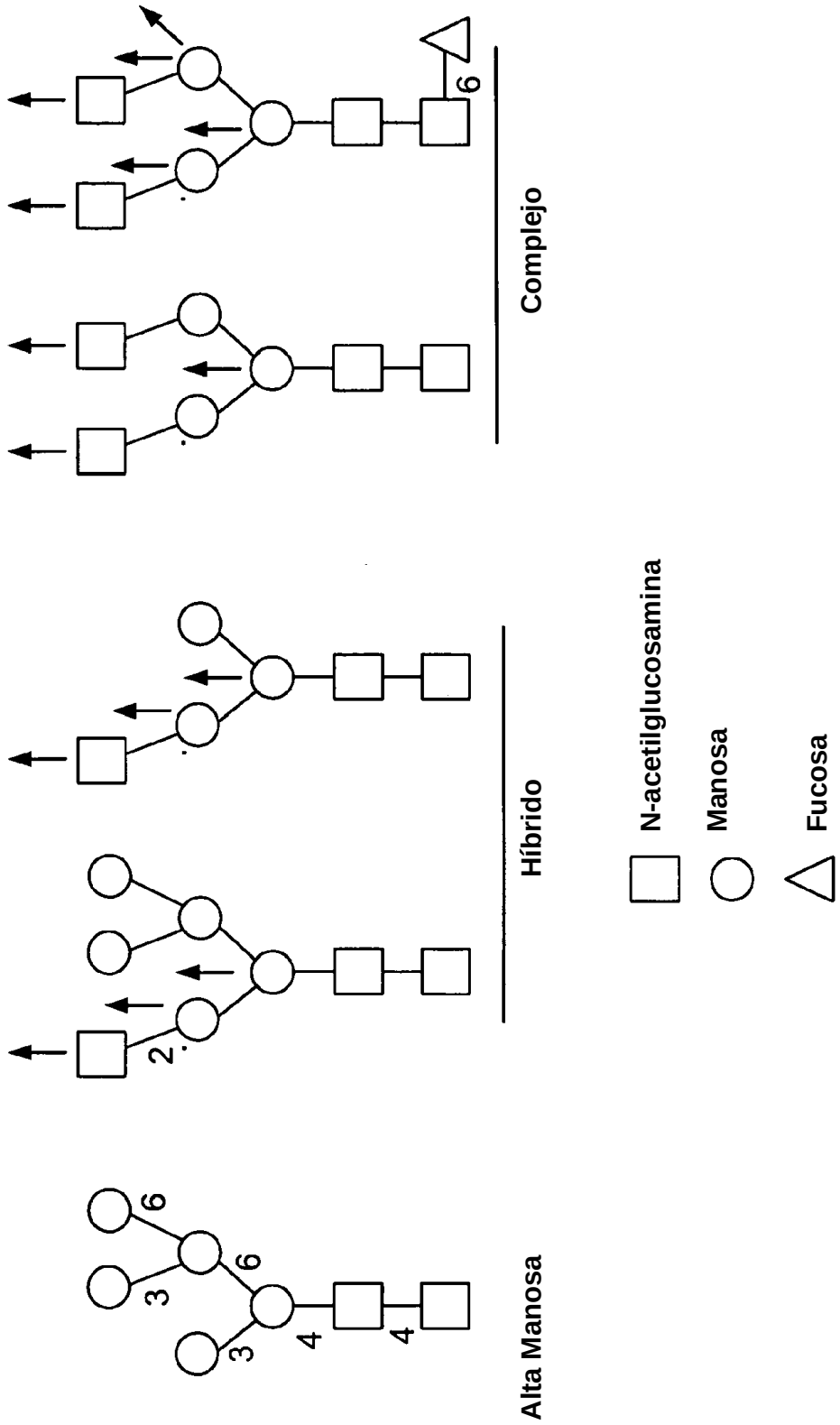

Alta Manosa
Híbrido
Complejo
N-acetilglucosamina
Manosa
Fucosa
2
3
3
4
4
6
6
6

FIG. 2

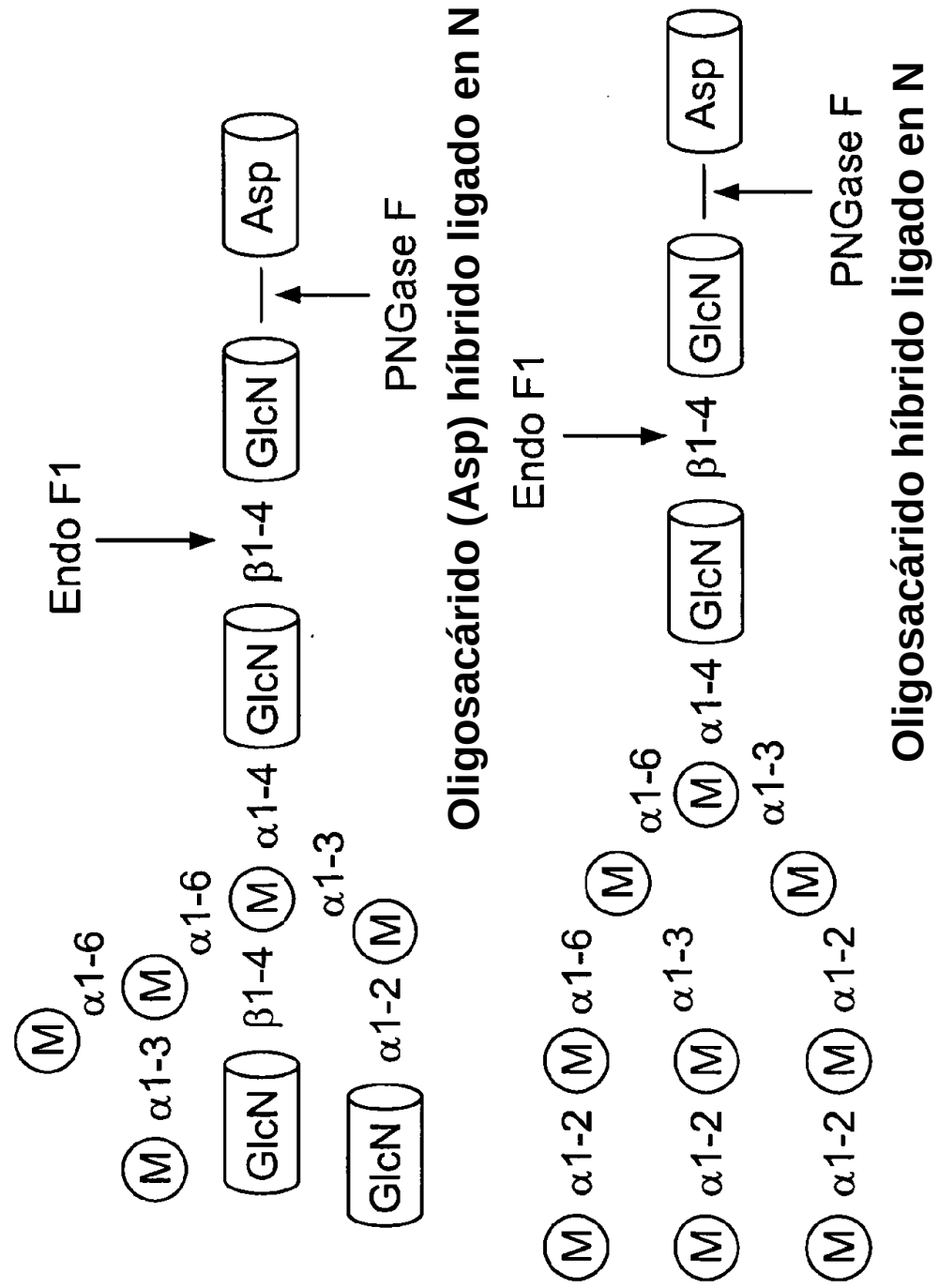

Endo F1
PNGase F
Oligosacárido (Asp) híbrido ligado en N
Oligosacárido híbrido ligado en N
M
α1-6
α1-3
α1-2
β1-4
α1-4
GlcN
Asp

FIG. 3A

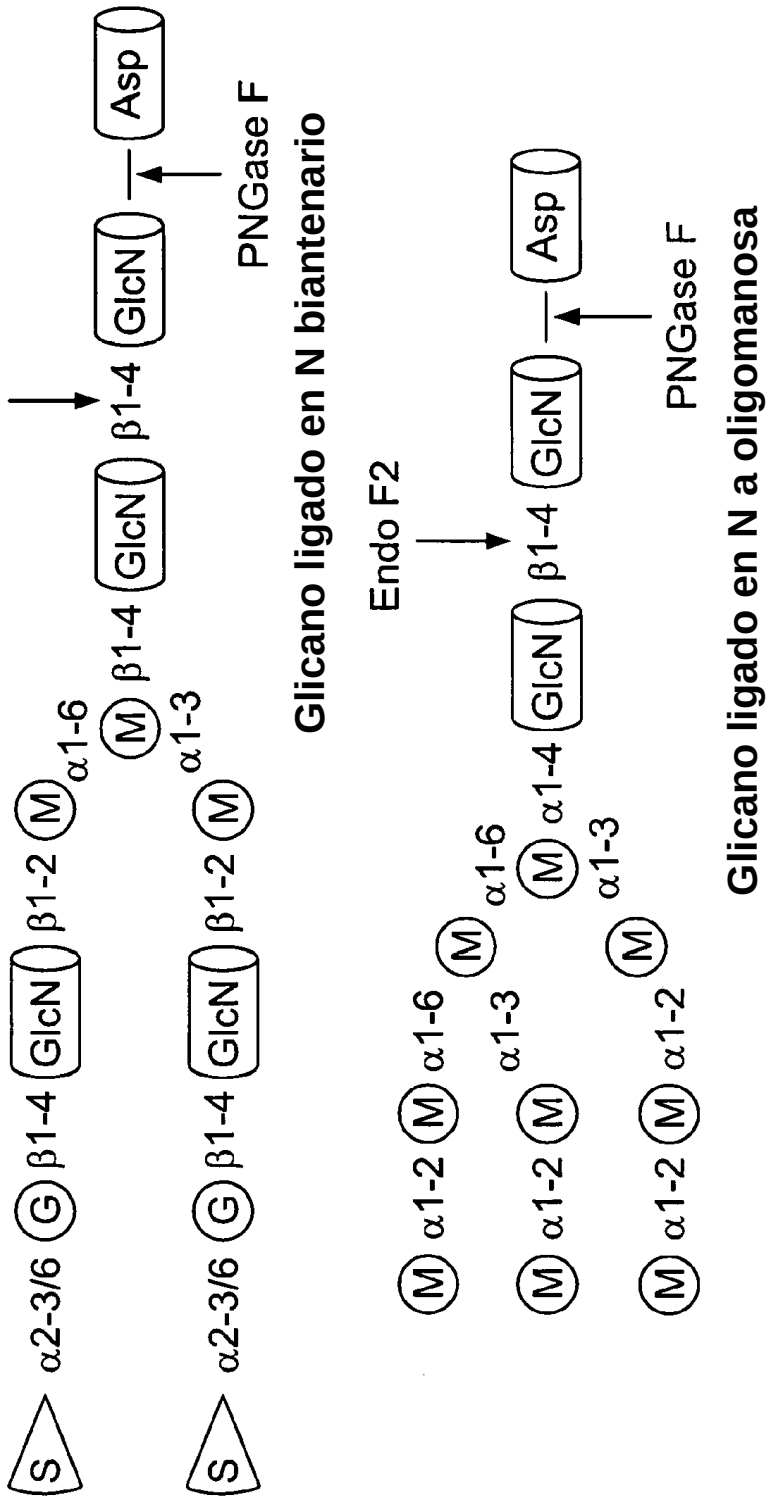

Endo F2
PNGase F
Glicano ligado en N biantenario
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
α1-6
α1-3
β1-4
GlcN
GlcN
Asp
Endo F2
PNGase F
Glicano ligado en N a oligomanosa
M
α1-2
M
α1-6
α1-3
M
α1-2
M
α1-6
α1-3
M
α1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
M
α1-2
M
α1-3
M
α1-2
M

FIG. 3B

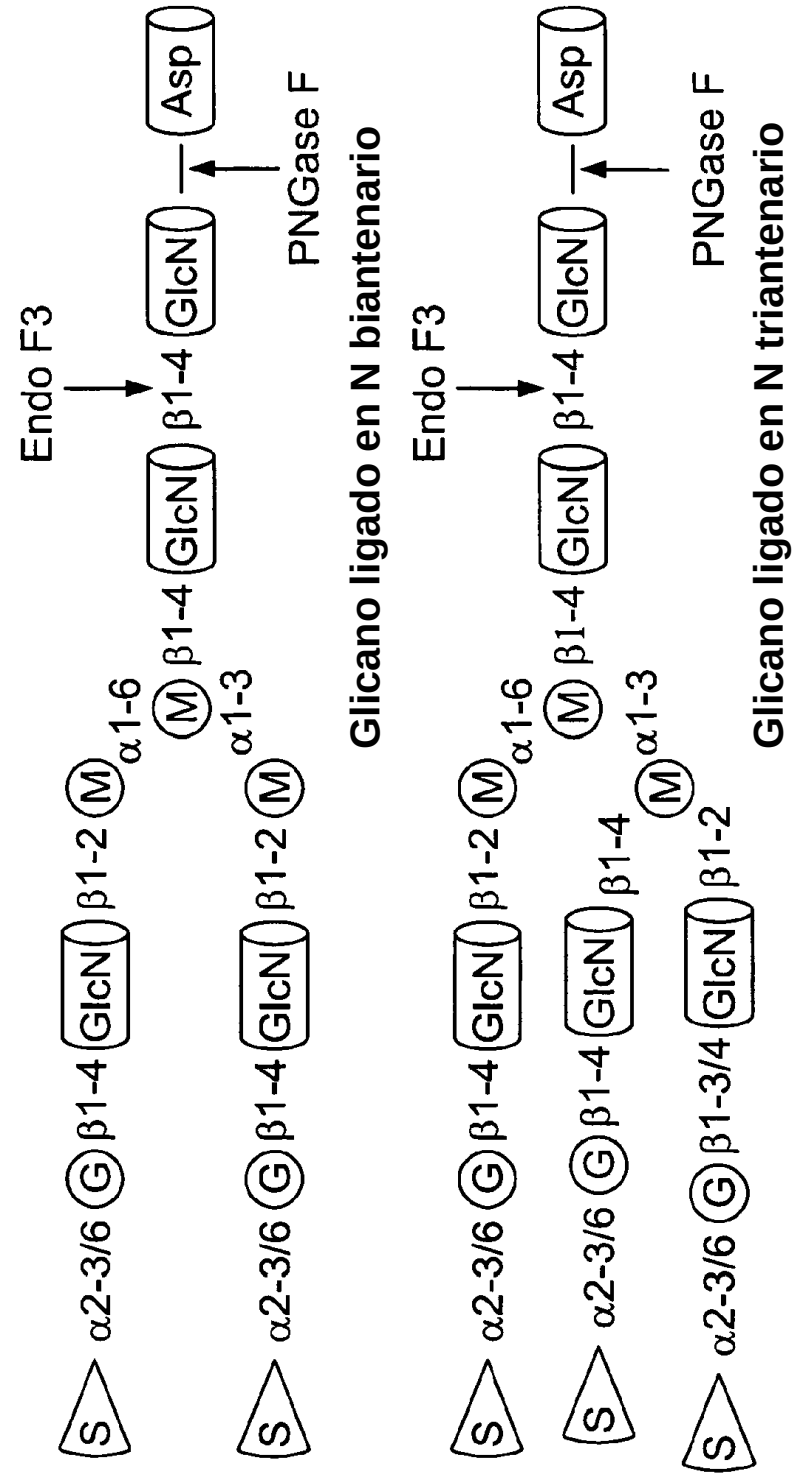

Endo F3
PNGase F
Glicano ligado en N biantenario
Endo F3
PNGase F
Glicano ligado en N triantenario

FIG. 3C

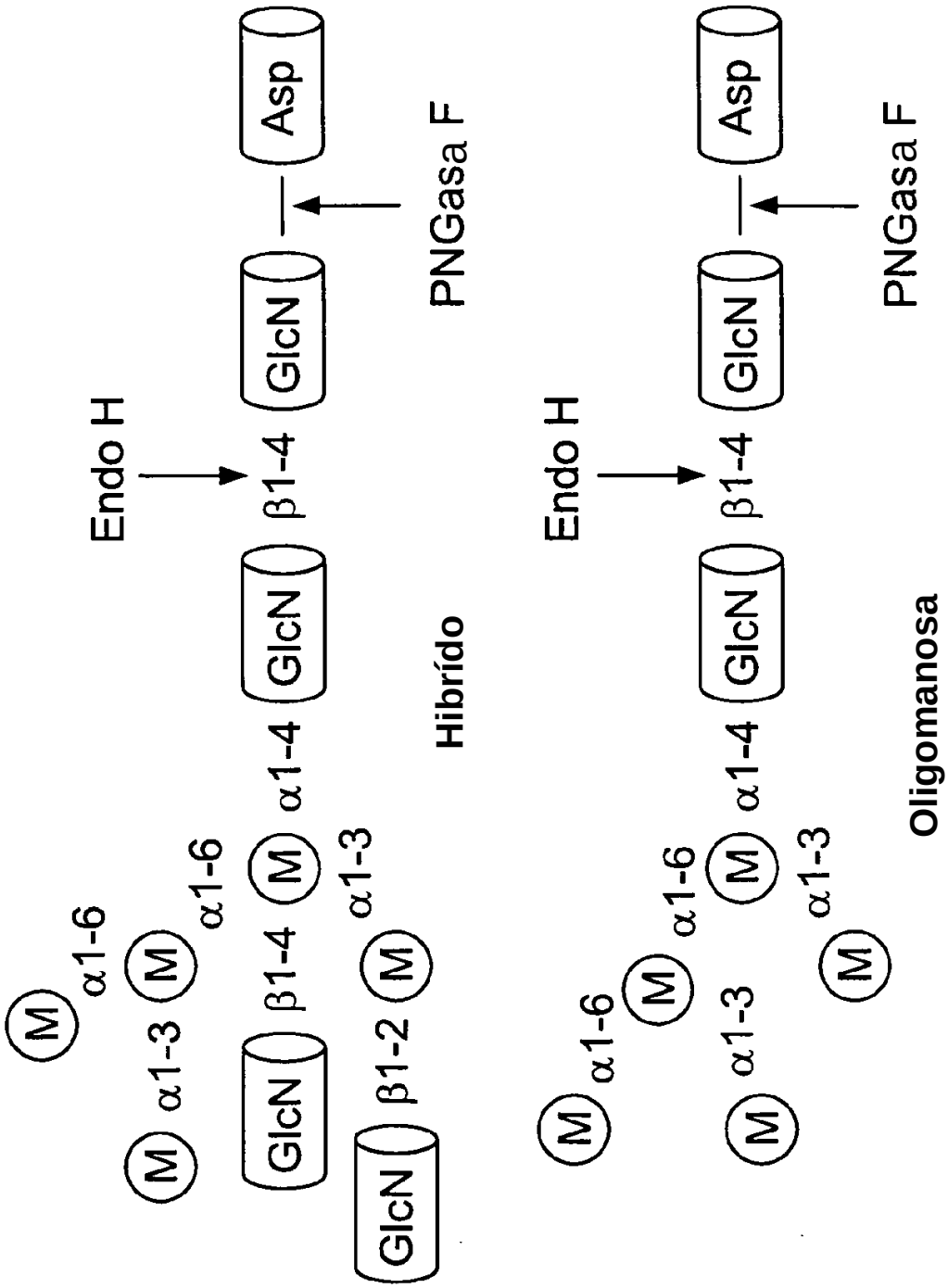

Endo H
PNGasa F
Asp
GlcN
β1-4
α1-4
α1-6
α1-3
β1-2
M
Hibrído
Oligomanosa

FIG. 3D

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Halozyme, Inc.
Wei, Ge
Panneerselvam, Krishnasamy
Bookbinder, Louis
Frost, Gregory I.

<120> POLIPÉPTIDOS PH20 SOLUBLES EXTENDIDOS Y USOS DE LOS MISMOS
<130> 3800020.00246/3074PC

<140> No se ha asignado
<141> Adjunto

<150> US 61/201,384
<151> 2008-12-09

<150> US 61/281,240
<151> 2009-11-13

<160> 215

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1530
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> cADN PH20 humano que codifica los aminoácidos 1-509

<400> 1
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 gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctacaatg cttcaccctc cacactatct gccacaatgt tcattgttag tattttgttt 1500
cttatcattt cttctgtagc gagtttgtaa 1530

<210> 2
<211> 1506
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20 optimizado de codón con sitios de restricción

<400> 2
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gcgtggcaag cctctgataa 1500
ggatcc 1506

<210> 3
<211> 507
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-507

<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 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
            500                 505
```

<210> 4
<211> 505
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-505

<400> 4

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

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

<210> 5
<211> 503
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-503

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

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

<210> 6
<211> 501
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-501

<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 499
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

<223> Precursor HuPH20 1-499

<400> 7

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

<210> 8
<211> 497
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-497

<400> 8
```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

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

```
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser
```

<210> 9
<211> 495
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-495

<400> 9

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

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
```

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


<210> 10
<211> 493
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-493

<400> 10
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15

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

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

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


<210> 11
<211> 491
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-491

<400> 11
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
```

```
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350

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


<210> 12
<211> 489
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-489

<400> 12
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
```

```
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220

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

<210> 13
<211> 490
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-490

<400> 13

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

Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
```

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

<210> 14
<211> 487
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-487

<400> 14

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

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

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser
                485


<210> 15
<211> 485
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-485

<400> 15
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
```

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

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300

Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser
                485
```

<210> 16
<211> 484

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-484

<400> 16
```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30

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

465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala
<210> 17
<211> 483
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-483

<400> 17
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45

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

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

```
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn
```

<210> 18
<211> 482
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-482

<400> 18

```
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> 19
<211> 481
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-481

<400> 19
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255

Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
```

```
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe
```

<210> 20
<211> 480
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-480

<400> 20

```
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> 21
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-479

<400> 21
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> 22
<211> 478
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-478

<400> 22
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> 23
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-477

<400> 23
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> 24
<211> 476
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-476

<400> 24
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
```

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

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


<210> 25
<211> 475
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-475

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

Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
```

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

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


<210> 26
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-474

<400> 26
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
```

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

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


<210> 27
<211> 473
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-473

<400> 27
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
```

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

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

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


<210> 28
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-472

<400> 28
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100   105   110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115   120   125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130   135   140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145   150   155   160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165   170   175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180   185   190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195   200   205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260   265   270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290   295   300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305   310   315   320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340   345   350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355   360   365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370   375   380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385   390   395   400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405   410   415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420   425   430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435   440   445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450   455   460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
465   470

<210> 29
<211> 471
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-471

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

```
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro
465                 470


<210> 30
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Precursor HuPH20 1-470

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

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

```
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys
465                 470


<210> 31
<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-469

<400> 31
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320

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

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

<210> 32
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-468

<400> 32
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn

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


<210> 33
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-467

<400> 33
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> 34
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-466

<400> 34
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1                5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
```

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


<210> 35
<211> 465
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-465

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

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


<210> 36
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-464

<400> 36
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


<210> 37
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-462

<400> 37
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
```

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


<210> 38
<211> 460
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-460

<400> 38
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
```

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


<210> 39
<211> 458
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-458

<400> 39
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
```

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

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


<210> 40
<211> 456
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-456

<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
    450                 455


<210> 41
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-454

<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
    450


<210> 42
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-452

<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
    450


<210> 43
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-450

<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
    450
```

<210> 44
<211> 508
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-508

<400> 44

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

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

<210> 45
<211> 506
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-506

<400> 45
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
```

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

<210> 46
<211> 504
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-504

<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 Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser
```

500

<210> 47
<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Precursor HuPH20 1-502

<400> 47
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95

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

```
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile
            500


<210> 48
<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-500

<400> 48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

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

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

<210> 49
<211> 498
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-498

<400> 49

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

```
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495
Ser Ile


<210> 50
<211> 496
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-496

<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 Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
```

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


<210> 51
<211> 494
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-494
<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
                485                 490


<210> 52
<211> 492
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-492

<400> 52
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
```

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


<210> 53
<211> 488
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-488

<400> 53
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
```

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

<210> 54
<211> 486
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor HuPH20 1-486

<400> 54

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

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

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro
                485
```

<210> 55
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-507

<400> 55

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

<210> 56
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-505

<400> 56
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1   5   10   15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20   25   30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35   40   45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50   55   60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65   70   75   80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85   90   95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100   105   110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115   120   125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130   135   140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145   150   155   160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165   170   175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180   185   190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195   200   205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210   215   220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225   230   235   240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245   250   255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260   265   270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275   280   285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290   295   300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305   310   315   320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325   330   335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340   345   350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355   360   365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370   375   380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385   390   395   400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405   410   415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420   425   430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435   440   445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
    450   455   460
Phe Leu Ile Ile Ser Ser
465   470

<210> 57

<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-503

<400> 57
```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
    450                 455                 460
Phe Leu Ile Ile
```

465

<210> 58
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-501

<400> 58
```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
```

```
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
    450                 455                 460
Phe Leu
465


<210> 59
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-499

<400> 59
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380

Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
```

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


<210> 60
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-497

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

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


<210> 61
<211> 460
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-495

<400> 61
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
```

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


<210> 62
<211> 458
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-493

<400> 62
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
```

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


<210> 63
<211> 456
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-491

<400> 63
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
```

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

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


<210> 64
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-489

<400> 64
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
```

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


<210> 65
<211> 455
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-490

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

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


<210> 66
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-487

<400> 66
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
```

```
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser
    450


<210> 67
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-485

<400> 67
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
```

```
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser
    450


<210> 68
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-484

<400> 68
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
```

```
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380

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

<210> 69
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-483

<400> 69

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

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

<210> 70
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-482

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

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


<210> 71
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-481

<400> 71
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> 72
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-480

<400> 72
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
```

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


<210> 73
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-479

<400> 73
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> 74
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-478

<400> 74
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> 75
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-477

<400> 75
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> 76
<211> 441
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-476

<400> 76

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

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

<210> 77
<211> 440
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-475

<400> 77

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

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

<210> 78
<211> 439
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-474

<400> 78

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15

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

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

<210> 79
<211> 438
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-473

<400> 79

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

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

Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400

Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met
        435


<210> 80
<211> 437
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-472

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

```
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285

Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320

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


<210> 81
<211> 436
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-471

<400> 81
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
```

```
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190

His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240

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

<210> 82
<211> 435
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-470

<400> 82
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
```

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


<210> 83
<211> 434
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-469

<400> 83
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
```

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

<210> 84
<211> 433
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> HuPH20 maduro 36-468

<400> 84

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

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

Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe
```

<210> 85
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-467

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

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

<210> 86
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-466

<400> 86

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

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

<210> 87
<211> 430
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-465

<400> 87

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

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


<210> 88
<211> 429
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-464

<400> 88
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
```

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

<210> 89
<211> 427
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-462

<400> 89

```
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
            420                 425
```

<210> 90
<211> 425
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-460

<400> 90

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

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

<210> 91
<211> 423
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-458

<400> 91

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

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

Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys
            420

<210> 92
<211> 421
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> HuPH20 maduro 36-456

<400> 92
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
```

```
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp
            420
<210> 93
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-454

<400> 93
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
```

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

<210> 94
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-452

<400> 94

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

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

<210> 95
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-450

<400> 95

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

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


<210> 96
<211> 473
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-508

<400> 96
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
```

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


<210> 97
<211> 471
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-506

<400> 97
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1                5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
```

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

Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val
465                 470


<210> 98
<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-504

<400> 98
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
```

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


<210> 99
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-502

<400> 99
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
```

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


<210> 100
<211> 465
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-500

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

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

<210> 101
<211> 463
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-498

<400> 101
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile

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

<210> 102
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-496

<400> 102

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

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


<210> 103
<211> 459
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-494

<400> 103
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
```

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


<210> 104
<211> 457
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-492

<400> 104
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
```

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


<210> 105
<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-488

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

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


<210> 106
<211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 maduro 36-486

<400> 106
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
```

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

Ala Ser Pro
    450

<210> 107
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 Humano 1-509

<400> 107
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
```

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

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


<210> 108
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 Humano Maduro 36-509

<400> 108
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
```

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


<210> 109
<211> 482
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> precursor rHuPH20 1-482

<400> 109
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
```

```
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 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> 110
<211> 1446
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ADN que codifica el precursor rHuPH20 soluble

<400> 110
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 gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

<210> 111
<211> 553
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> PH20 Bovino

<400> 111
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> 112
<211> 545
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> PH20 de Conejo

<400> 112
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Gly Ser Ala Val Glu
 1               5                  10                  15
Leu Ser Gly Val Phe Gln Ile Val Phe Ile Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Ala Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Thr Glu Phe Cys Leu Gly Lys Ser
    50                  55                  60
Gly Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Lys Asn Lys Thr Gly Gln Gly Ile Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Pro His Thr Gly Ala Ile Val His Gly
```

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

Tyr Leu His Leu Asn Pro Gly Asn Phe Ala Ile Gln Leu Gly Ser Asn
                405                 410                 415
Gly Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Pro Thr Leu Thr Asp Leu Glu Gln
            420                 425                 430
Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys
        435                 440                 445
Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val
    450                 455                 460
Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr
465                 470                 475                 480
Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr
                485                 490                 495
Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His
            500                 505                 510
Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn
        515                 520                 525
Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu
    530                 535                 540
Lys
545
<210> 113
<211> 114
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 de Oveja (parcial)

<400> 113
```

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


<210> 114
<211> 510
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<220>
<223> PH20 de Mono cinomolgo

<400> 114
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Val Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys
        115                 120                 125
Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg
        195                 200                 205
Ser Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Val Val
            260                 265                 270
Val Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala
    290                 295                 300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Ser Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
```

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

Ile Asp Ala Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
465                 470                 475                 480
Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
                485                 490                 495
Val Asn Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
            500                 505                 510


<210> 115
<211> 529
<212> PRT
<213> Cavia porcellus

<220>
<223> PH20 de Conejillo de Indias

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

```
Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
            260                 265                 270
Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile
    290                 295                 300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp
305                 310                 315                 320
Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
            340                 345                 350
Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
    370                 375                 380
Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
                405                 410                 415
Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
            420                 425                 430
Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
        435                 440                 445
Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
465                 470                 475                 480
Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
                485                 490                 495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
            500                 505                 510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
        515                 520                 525
Leu
```

<210> 116
<211> 512
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> PH20 de Rata

<400> 116

```
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> 117
<211> 512
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> PH20 de Ratón

<400> 117
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> 118
<211> 520
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 de Oveja

<400> 118
Leu Asp Phe Pro Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ala Glu Arg Cys Val Lys Ile Phe Lys Leu Pro
```

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

<210> 119
<211> 474

<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> PH20 de Vaca

<400> 119
Met Gly Met Phe Arg Arg His His Ile Ser Phe Arg Ser Phe Ala Gly
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Thr Pro Gln Ala Val Phe Thr Phe Leu Leu Leu Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Ala Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Val Glu Arg Cys Val Asn Arg Arg
    50   55   60
Phe Gln Leu Pro Pro Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro
65   70   75   80
Gln Lys Ser Ala Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg
                85   90   95
Leu Gly Tyr Tyr Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Lys Thr Val Phe
            100   105   110
Gly Gly Ile Pro Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ser His Leu Glu Lys Ala
        115   120   125
Lys Asn Asp Ile Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala
    130   135   140
Val Ile Asp Trp Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys
145   150   155   160
Pro Lys Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys
                165   170   175
Asn Pro Gln Leu Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp
            180   185   190
Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly
        195   200   205
Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp
    210   215   220
Cys Tyr Asn His Asn His Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro
225   230   235   240
Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu
                245   250   255
Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser
            260   265   270
Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile
        275   280   285
Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val
    290   295   300
Tyr Ala Arg Pro Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln
305   310   315   320
Gly Asp Leu Val Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ser Leu Gly Ala Ser
                325   330   335
Gly Ile Ile Met Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Val Gln Ser
            340   345   350
Cys Met Asn Leu Gly Thr Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile
        355   360   365
Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His
    370   375   380
Asp Gly Gly Val Cys Thr Arg Lys His Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu
385   390   395   400
His Leu Asn Pro Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Glu Gly Gly Lys
                405   410   415
Tyr Thr Val Pro Gly Thr Leu Thr Leu Glu Asp Leu Gln Lys Phe Ser
            420   425   430
Asp Thr Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Asn Leu Ser Cys Lys Lys Arg
        435   440   445
Val Asp Ile Lys Asn Val His Ser Val Asp Val Cys Met Ala Glu Asp
    450   455   460
Val Cys Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro
465   470

<210> 120
<211> 517
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 de Oveja (Halozima)

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

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

```
        435                 440                 445
Ser Thr Thr Thr Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Thr Ala Thr Thr
    450                 455                 460
Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys Gln Ser Pro Glu Cys Leu Lys Val
465                 470                 475                 480
Arg Cys Leu Glu Ala Ile Ala Asn Val Thr Gln Thr Gly Cys Gln Gly
                485                 490                 495
Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ile Gln Asn Ile Lys
            500                 505                 510
Asn Gln Thr Thr Tyr
        515
```

<210> 121
<211> 1620
<212> ADN
<213> Ovis aries

<220>
<223> ADN que codifica PH20 de oveja en la SEQ ID NO:118

<400> 121
```
ttttccgtgt tggttggctc tggacttcag agcaccccct ctcatttcaa acacttcttt 60
cctctgggcc tggaatgccc cagctgaacg ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
attattttat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaacac 240
tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaaa aagccaaaaa 300
agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
tgagttggtt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaaa 480
agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
acttcggcca aatcacttat ggggttatta tctttttcct gattgttaca atcataatta 600
taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
cgactggttg tggaaggaaa gcactgccct tttcccttct gtttatttga atatcaagtt 720
aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcggtt 780
gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttggtgagat 900
cgttgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
aaggaaacaa tggaattcaa gcgactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
aactgggaaa ggtggaaaat acacagtacc tgggaaagtc acacttgaag acctgcaaac 1200
gttttctgat aaattttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagagggccc 1320
tgtgaagtta caacccagtg atcattcctc tagccagaat gaggcatcta ctaccaccgt 1380
cagcagtatc tcaccctcta ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
gtcccctgag tgcctcaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
gtgtcaaggt gttaaatgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
tcaaacaacc tattaaaata taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
```

<210> 122
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-482

<400> 122
```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
```

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


<210> 123
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-481

<400> 123
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
```

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

Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
        435                 440                 445


<210> 124
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-480

<400> 124
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
```

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

<210> 125
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-479

<400> 125

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

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

<210> 126
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-478

<400> 126

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

```
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140

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


<210> 127
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 soluble 36-477

<400> 127
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
```

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

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


<210> 128
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-467

<400> 128
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
```

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

<210> 129
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-477

<400> 129
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys

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

<210> 130
<211> 478
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-478
```

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

Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260   265   270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290   295   300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305   310   315   320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340   345   350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355   360   365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370   375   380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385   390   395   400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405   410   415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420   425   430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435   440   445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys 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> 131
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-479

<400> 131
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100   105   110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115   120   125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130   135   140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145   150   155   160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165   170   175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180   185   190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195   200   205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260   265   270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290   295   300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305   310   315   320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340   345   350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355   360   365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370   375   380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385   390   395   400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405   410   415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420   425   430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435   440   445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp 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> 132
<211> 480
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-480

<400> 132
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100   105   110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115   120   125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130   135   140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145   150   155   160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165   170   175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180   185   190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195   200   205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260   265   270

Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290   295   300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305   310   315   320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340   345   350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355   360   365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370   375   380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385   390   395   400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405   410   415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420   425   430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435   440   445
Val Lys Asp Thr Asp Ala 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> 133
<211> 481
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-481

<400> 133
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
```

```
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr 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> 134
<211> 483
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Precursor sHuPH20 1-483

<400> 134

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

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

<210> 135
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 maduro 36-467

<400> 135

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

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


<210> 136
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 maduro 36-483

<400> 136
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
```

```
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445


<210> 137
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> variante P48A de precursor PH20

<400> 137
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Ala
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240

Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
```

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

<210> 138
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> variante L499W de precursor PH20

<400> 138

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

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

<210> 139
<211> 1449
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Secuencia mARN del gen2

<400> 139

```
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
```

<210> 140
<211> 6630
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Vector HZ24

<400> 140
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 aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa 2520
cgccctctc cctccccccc 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
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attctttga 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
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> 141
<211> 186
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> dihidrofolato reductasa

<400> 141
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 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> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Hexa His Tag

<400> 142
His His His His His His
 1   5

<210> 143
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Etiqueta Flag

<400> 143
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1   5

<210> 144
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de señal IgK humano

<400> 144
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1   5   10   15
Leu Pro Gly Ala Arg Gly
            20

<210> 145
<211> 21
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Péptido de señal IgK de ratón

<400> 145
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1   5   10   15
Gly Ser Thr Gly Asp
            20

<210> 146
<211> 1500
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-SSVA con sitios de restricción
      NheI y BamHI

<400> 146
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gcgtggcatg ataaggatcc 1500

<210> 147
<211> 1494
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-IISS con sitios de restricción
      NheI y BamHI

<400> 147
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600

cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gctgataagg atcc 1494

<210> 148
<211> 1488
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-FLII con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 148
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatgat aaggatcc 1488

<210> 149
<211> 1482
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-ILFL con sitios de restricción NheI y BamHI
<400> 149
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360

acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg tgataaggat cc 1482

<210> 150
<211> 1476
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-VSIL con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 150
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat actttgataa ggatcc 1476

<210> 151
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-FIVS con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 151
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60

ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatcttg ataaggatcc 1470

<210> 152
<211> 1464
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-TMFI con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 152
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tctgataagg atcc 1464

<210> 153
<211> 1458
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN optimizado de codón SPAM1-SATM con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 153
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgtgat aaggatcc 1458

<210> 154
<211> 1452
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-TLSA con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 154
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
tgataaggat cc 1452

<210> 155

<211> 1446
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-PSTL con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 155
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgtgataa 1440
ggatcc 1446

<210> 156
<211> 1440
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-ASPS con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 156
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320

actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctcctg ataaggatcc 1440

<210> 157
<211> 1434
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-YNAS con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 157
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cctgataagg atcc 1434

<210> 158
<211> 1431
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-FYNA con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 158
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080

gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct gataaggatc c 1431

<210> 159
<211> 1428
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-IFYN con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 159
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaactgat aaggatcc 1428

<210> 160
<211> 1425
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-QIFY con sitios de restricción NheI y BamHI
<400> 160
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960

ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tactgataag gatcc 1425

<210> 161
<211> 1422
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-PQIF con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 161
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tgataaggat cc 1422

<210> 162
<211> 1419
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-EPQI con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 162
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780

gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatctga taaggatcc 1419

<210> 163
<211> 1416
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-EEPQ con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 163
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagtgataa ggatcc 1416

<210> 164
<211> 1413
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-TEEP con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 164
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600

cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ctgataagga tcc 1413

<210> 165
<211> 1410
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-ETEE con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 165
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagtg ataaggatcc 1410

<210> 166
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-METE con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 166
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480

gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgagtgata aggatcc 1407

<210> 167
<211> 1404
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-PMET con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 167
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga cttgataagg atcc 1404

<210> 168
<211> 1401
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-PPME con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 168
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300

ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggagt gataaggatc c 1401

<210> 169
<211> 1398
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-KPPM con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 169
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatgtgat aaggatcc 1398

<210> 170
<211> 1395
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-LKPP con sitios de restricción NheI y BamHI
<400> 170
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180

ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccatgataag gatcc 1395

<210> 171
<211> 1392
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-FLKP con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 171
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
tgataaggat cc 1392

<210> 172
<211> 1389
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-AFLK con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 172

gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagtga 1380
taaggatcc 1389

<210> 173
<211> 1386
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-DAFL con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 173
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctctgataa 1380
ggatcc 1386

<210> 174
<211> 1383
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-IDAF con sitios de restricción

NheI y BamHI

<400> 174
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt ttgataagga 1380
tcc 1383

<210> 175
<211> 1380
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-CIDA con sitios de restricción
NheI y BamHI
<400> 175
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctg ataaggatcc 1380

<210> 176
<211> 1377
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-VCID con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 176
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgactgata aggatcc 1377

<210> 177
<211> 1374
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-GVCI con sitios de restricción NheI y BamHI

<400> 177
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta tttgataagg atcc 1374

<210> 178
<211> 1371
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-DGVC con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 178
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgtt gataaggatc c 1371

<210> 179
<211> 1365
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-IADG con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 179
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat gggtgataag gatcc 1365

<210> 180
<211> 1359
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-VCIA con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 180
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgcctga taaggatcc 1359

<210> 181
<211> 1353
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-VDVC con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 181
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg ctgataagga tcc 1353

<210> 182
<211> 1347

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-DAVD con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 182
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgactgata aggatcc 1347

<210> 183
<211> 1341
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-DTDA con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 183
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgcct gataaggatc c 1341

<210> 184

<211> 1335
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-VKDT con sitios de restricción
NheI y BamHI

<400> 184
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
acttgataag gatcc 1335

<210> 185
<211> 1329
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-ADVK con sitios de restricción
NheI y BamHI
<400> 185
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaatga 1320
taaggatcc 1329

<210> 186

<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de señal PH20

<400> 186
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr
        35

<210> 187
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis

<400> 187
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100   105   110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115   120   125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130   135   140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145   150   155   160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165   170   175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180   185   190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195   200   205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260   265   270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290   295   300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305   310   315   320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335

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

<210> 188
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis-N368A (mut1)

<400> 188
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 Ala
        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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 189
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis-N393A (mut2)

<400> 189
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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 190
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis-N368A/N393A (mut3)

<400> 190
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 Ala
        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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 191
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-447

<400> 191
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1               5                  10                  15
Tyr



<210> 192
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-446

<400> 192
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
 1               5                  10                  15
```

<210> 193
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-445

<400> 193
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 1   5   10   15

<210> 194
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-444

<400> 194
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
 1   5   10

<210> 195
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-443

<400> 195
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 1   5   10

<210> 196
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de la terminal C escindido de rHuPH20 aa 431-442

<400> 196
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
 1   5   10

<210> 197
<211> 510
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<220>
<223> PH20 de Chimpancé

<400> 197
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45

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

<210> 198
<211> 512
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<220>
<223> PH20 de Mono Rhesus

<400> 198
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Asn Ile Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85   90   95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly
            100   105   110
Gly Ile Pro Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys
        115   120   125
Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130   135   140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145   150   155   160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165   170   175
Val Gln Leu Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180   185   190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg
        195   200   205
Ser Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210   215   220
Tyr Asn His His Tyr Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp
225   230   235   240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245   250   255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Val Val
            260   265   270
Val Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275   280   285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala
    290   295   300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu
305   310   315   320
Leu Val Ser Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325   330   335
Val Ile Trp Gly Ser Leu Ser Ile Thr Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340   345   350
Leu Leu Asp Thr Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355   360   365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370   375   380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385   390   395   400
Asn Pro Asp Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405   410   415
Val His Gly Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys
            420   425   430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435   440   445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450   455   460
Ile Asp Ala Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
465   470   475   480
Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
                485   490   495
Trp Arg Leu Glu Val Trp Asp Gln Gly Ile Ser Arg Ile Gly Phe Phe
            500   505   510

<210> 199
<211> 1485
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-LFLI con NheI y BamHI
<400> 199
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg atttgataag gatcc 1485

<210> 200
<211> 1479
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-SILF con NheI y BamHI

<400> 200
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380

ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttctga taaggatcc 1479

<210> 201
<211> 1473
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN optimizado de codón SPAM1-IVSI con NheI y BamHI

<400> 201
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat atgataagga tcc 1473

<210> 202
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N82A

<400> 202
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 203
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N166A

<400> 203
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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495
<210> 204
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N235A

<400> 204
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
```

```
65                  70                  75                  80
Ile Asn 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 205
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N254A

<400> 205
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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495
```

<210> 206
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PH20sHis N82A/N166A

<400> 206

```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Ala 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495
```

<210> 207
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N82A/N254A

<400> 207
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35   40   45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50   55   60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65   70   75   80
Ile Ala 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 208
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N166A/N254A

<400> 208
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Ala 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495


<210> 209
<211> 496
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis N82A/N166A/N254A

<400> 209
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1                5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Ala 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 Ala 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 Ala 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 His His His His His His
                485                 490                 495
```

<210> 210
<211> 1494
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PH20sHis ADN

<400> 210
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactcttaa cttcagagct 120
ccccctgtaa tcccaaacgt ccccttcctg tgggcatgga acgcccctag cgaattctgt 180
ttggggaaat ttgacgaacc tctggacatg tctctgtttt cttttatcgg tagccctcga 240
atcaacgcta ccggacaggg ggtgacaatc ttttacgtgg atcgtctggg ctattaccct 300
tacatcgaca gcattactgg ggtgaccgtg aacggaggca ttcctcagaa aatatcactg 360
caggaccacc tggacaaagc taagaaggat attacattct acatgccagt ggacaatctc 420
ggaatggctg tgattgactg ggaggagtgg agacctactt gggcccgaaa ttggaagccc 480
aaggatgtgt ataagaaccg atccattgag ctggtgcagc agcagaacgt gcagctgtcc 540
cttacagaag ccaccgaaaa agctaagcag gaattcgaga aagctgggaa ggatttcctg 600
gttgagacaa taaaacttgg gaaactgctt agacctaacc acctctgggg ctattatttg 660
ttccccgatt gctacaatca ccactataag aagcccggct acaacggatc ttgtttcaac 720
gtcgaaatta aaagaaacga tgacctctct tggttgtgga atgagtctac tgcactctac 780
ccctctatat atctcaacac acagcagtcc ccagtagccg ctaccctcta cgttcggaat 840
agagtgaggg aagccatcag ggtgtccaag atccccgatg ccaaatctcc cctcccagtg 900
tttgcctaca ccaggatcgt gtttaccgac caggtgttga agttcctgag ccaggacgag 960
ctcgtgtata cttttggcga gacagttgct ctgggagcct ctgggatcgt gatctggggc 1020
actctgagta ttatgcgatc aatgaagtcc tgcctgctgt tggataacta catggagaca 1080
atcctgaacc catatatcat taacgtgact ttggccgcta agatgtgttc acaggtgctg 1140
tgtcaagagc agggagtatg cattaggaag aactggaact caagcgatta tctccatctg 1200
aacccagata attttgcaat ccagctggaa aagggtggta aattcactgt ccgagggaag 1260
cccacactcg aggatctcga acagtttagt gaaaagttct actgtagctg ctatagcact 1320
ctgagttgta aggaaaaagc cgatgtgaaa gacactgatg ccgttgacgt ttgcatcgcc 1380
gatggggtgt gtattgacgc ctttctcaag ccaccaatgg agactgagga gccccagatc 1440
ttttacaacg cctccccctc caccttgagt catcatcatc atcatcatta gtaa   1494

<210> 211
<211> 1497
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SPAM1-ISSV

<400> 211
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240

tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gcgtgtgata aggatcc 1497

<210> 212
<211> 1491
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SPAM1-LIIS

<400> 212
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcat gataaggatc c 1491

<210> 213
<211> 1467
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SPAM1-MFIV

<400> 213
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60

ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatgata aggatcc 1467

<210> 214
<211> 1461
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SPAM1-ATMF

<400> 214
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttct gataaggatc c 1461

<210> 215
<211> 1455
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SPAM1-LSAT

<400> 215
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
acctgataag gatcc 1455