



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO CO-FORMULACIÓN ESTABLE DE HIALURONIDASA E
INMUNOGLOBULINA, Y MÉTODOS DE SU USO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 9/00

71. SOLICITANTE Baxter Healthcare, S.A. Y Baxter International, Inc.

DOMICILIO Glattpark (Opfikon), Suiza y Deerfield, Illinois, Estados Unidos.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **Baxter Healthcare, S.A.,
Baxter International, Inc**

Dirección: Thurgauerstrasse 130, CH-8152
Glattpark (Opfikon), Suiza. // One Baxter
Parkway, Deerfield, IL 60015, Estados Unidos
de América.

Nacionalidad o domicilio: Glattpark
(Opfikon), Suiza Y Deerfield, Illinois, Estados
Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882 TP 20824

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/002545 Fecha 16 de septiembre de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/034604 A9 Fecha 24 de marzo de 2011

6

TÍTULO (54) CO-FORMULACIÓN ESTABLE DE HIALURONIDASA E
INMUNOGLOBULINA, Y MÉTODOS DE SU USO.

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 9/00

8 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

17 de septiembre de 2009

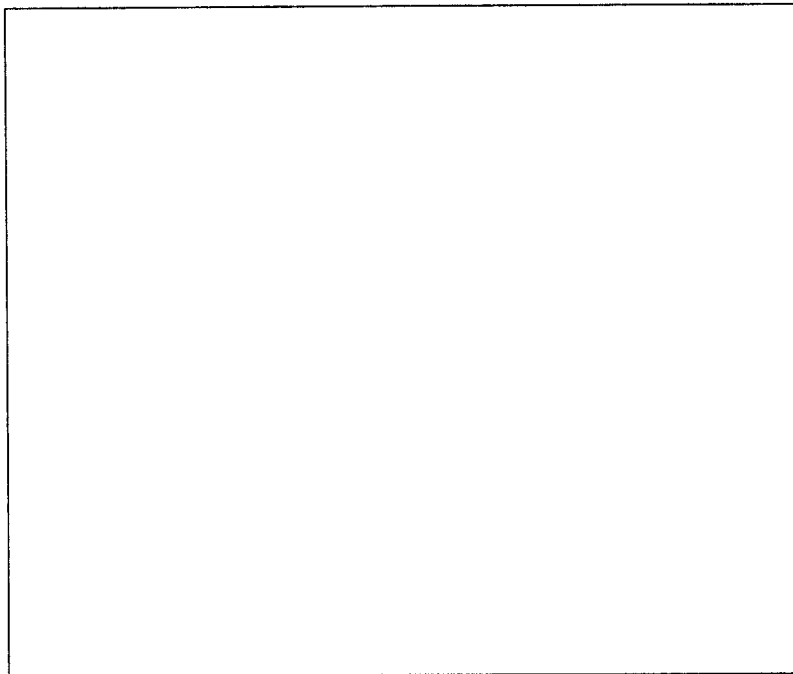
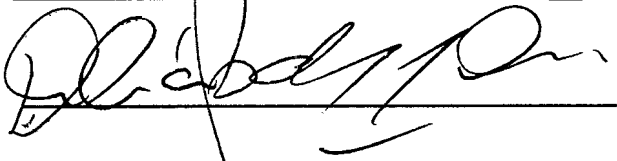
(31) Número de Solicitud

61/277.045

9 Comprobante de pago No. 12-28242 // 12-28243 // 12-28244 // 12-28270 // 12-20349 // 12-18531

Fecha 21 de marzo de 2012

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones Regla 4.17
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

1.) **TESCHNER, Wolfgang**
(Gestettengasse 19/14, A-1030 Wien, Austria);
2.) **SVATOS, Sonja**
(Kapellengasse 42, A-2413, Berg, Austria);
3.) **BRUCKSCHWAIGER, Leopold**
(Herminengasse 5/14, A-1020 Wien, Austria);
4.) **WEBER, Alfred**
(Skraupstrasse 24/42/8, A-1210 Wien, Austria);
5.) **SCHWARZ, Hans-Peter**
(Weimarer Strasse 76, A-1180 Wien, Austria);
6.) **LEI, Laura**
(11452 Clarkson Road, Los Angeles, California 90064, Estados Unidos de América).

000002

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0028242

Bogotá D.C., Marzo 21 de 2012 - 17:10:32

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325109562	20/03/2012	66.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

000003

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 21 de 2012 - 17:10:45

P- 3295

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

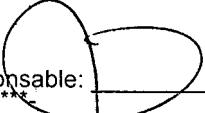
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0028243
		Bogotá D.C., Marzo 21 de 2012 - 17:10:32

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325109562	20/03/2012	66.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060153- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

000

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0028244

Bogotá D.C., Marzo 21 de 2012 - 17:10:32

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325109562	20/03/2012	66.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 374

000005

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 21 de 2012 - 17:10:45

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

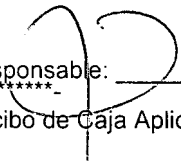
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0028270
		Bogotá D.C., Marzo 21 de 2012 - 17:10:32

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

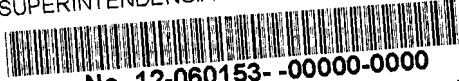
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325109562	20/03/2012	66.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1642 S.DISTINTIVO CAMBIOO TITULARIDAT-TRANSFERENCIA INSCRIPC	370.000.00 370.000.00
			\$370.000.00
=====			

SON: **TRESCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060153--00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

000000

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0020349

Bogotá D.C., Febrero 28 de 2012 - 06:32:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325098616	24/02/2012	56.630.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50.000.00	50.000.00
				\$50.000.00

SON: **CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

000007

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 28 de 2012 - 06:32:34

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0018531
		Bogotá D.C., Febrero 23 de 2012 - 16:45:47

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450333111	23/02/2012	18.800.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00 20.000.00
			\$20.000.00
=====			

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060153- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

000008



The State of Maryland

Office of the Secretary of State

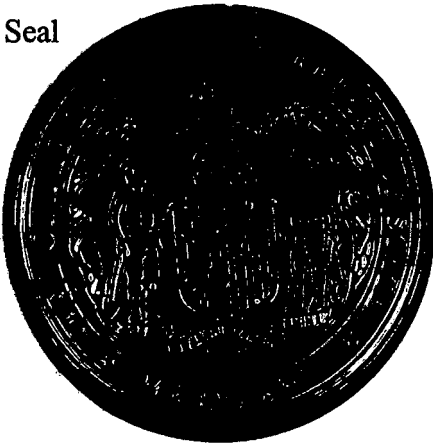
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

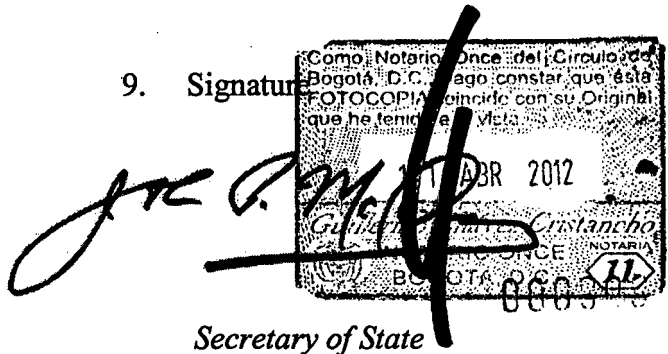
1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by **Robert P. Duckworth**
3. acting in the capacity of **Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County**
4. bears the seal/stamp of the **Circuit Court for Anne Arundel County**

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the 6th day of December, 2010
7. by The Secretary of State of Maryland
8. Seal



9. Signature _____



Secretary of State

No. 270203

9

To All To Whom These Presents Shall Come
Based upon available information
US Legalization

Authenticates that the attached document signed by

James D. Smith

notarized by

Marcia L. Harding

is true and accurate

Deborah Campbell

Deborah Campbell

Authorized Signature

On this day of December 6th, 2010, I, Ahmad Miski, Notary Public, Anne Arundel County, State of Maryland, do hereby certify under the Oath of my Office and Seal that the signature of Deborah Campbell is true and correct.

My commission expires on May 28th, 2013

97202

State of Maryland, Anne Arundel County, Sect.

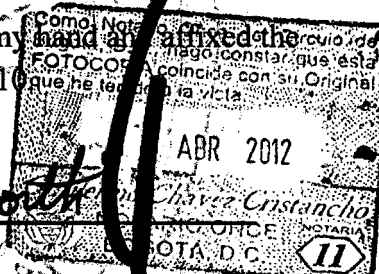
I, ROBERT P. DUCKWORTH, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that Ahmad Miski was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 5th day of May, 2009.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and seal of the court this 6th day of December, 2010

Robert P. Duckworth

Robert P. Duckworth, Clerk

Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland



LO
/10

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

an organization existing under the laws of Switzerland

and in present execution of its business activity, domiciled Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Switzerland.

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ DALEMANN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

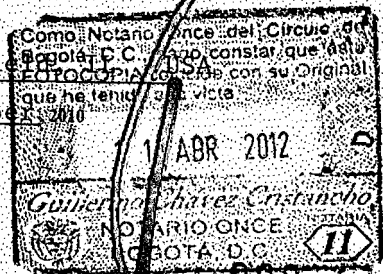
- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks; Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Deerfi
on this 22 day of Novemb

Firma / Signature
Name/Title:

Marcia L. Scolding
(Signature)

My Commission expires June 28, 2014



STATEMENT

I, James D. Smith, as legal representative of **BAXTER HEALTHCARE S.A.** in my capacity of Assoc. General & Chief IP Counsel state that **BAXTER HEALTHCARE S.A.** is duly organized in Switzerland, existing and addressed in **Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Switzerland** and I am duly authorized to sign on its behalf in Industrial Property matters and to grant Power of Attorney to third parties, in accordance with the above mentioned position and by Power of Attorney of said entity, taken on the day of **05 March 2009** in the city of **Wallisellen, Switzerland**.

Name: James D. Smith

Title: Assoc. General & Chief IP Counsel

GRANTOR/ APPLICANT: **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

SIGNATURE:

James D. Smith

DATE: Nov. 22, 2010

NOTARIZATION REQUIRED

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2010, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of ILLINOIS
Marcia L Harding
(Signature)
NOTARY PUBLIC
My Commission expires June 28, 2014



12
70

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés.

A todos los que vieren el presente documento
con base en la información disponible
LEGALIZACIONES DE LOS ESTADOS UNIDOS
Autentica que el documento adjunto firmado por
James D. Smith
protocolizado por
Marcia L. Harding
Es auténtica y correcta
(Firmado) Deborah Campbell. Firma autorizada.

Este día 6 de diciembre de 2010, yo, Ahmad Miski, Notario Público del Condado de Anne Arundel, Estado de Maryland, certifico bajo juramento en mi Oficina y con mi Sello que la firma de Deborah Campbell es auténtica y correcta.

(Firmado) Mi comisión vence el 28 de mayo de 2013.

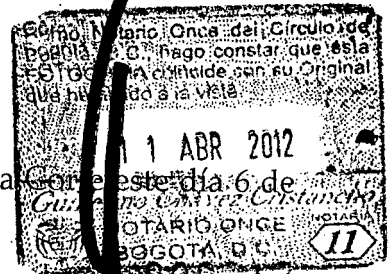
97202

Estado de Maryland, Condado de Anne Arundel, Sct.

Yo, Robert P. Duckworth, Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel, Maryland, una corte de registro, certifico por el presente que Ahmad Miski fue comisionado/nombrado y certificado Notario Público a partir del día 5 de mayo de 2009.

En constancia de lo anterior, he firmado y puesto el sello de la Corte este día 6 de diciembre de 2010.

(Firmado) Robert P. Duckworth, Registrador



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Corte del Circuito del Condado de Anne Arundel, Maryland.

Hay un sello de la Corte del Condado. -

DECLARACIÓN

"Yo, James D. Smith, como Representante Legal de BAXTER HEALTHCARE S.A., en mi calidad de Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP, declaro que BAXTER HEALTHCARE S.A., está debidamente organizada en el Estado de California, Estados Unidos, existente y con dirección en Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Suiza y estoy debidamente autorizado para firmar en su nombre en asuntos de propiedad industrial y para otorgar Poder a terceros, de acuerdo con el cargo anteriormente mencionado y por Poder de dicha entidad, tomado el día 5 de marzo de 2009 en la ciudad de Wallisellen, Suiza.

Nombre: James D. Smith

Cargo: Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP

Otorgante/Solicitante: BAXTER HEALTHCARE S.A.

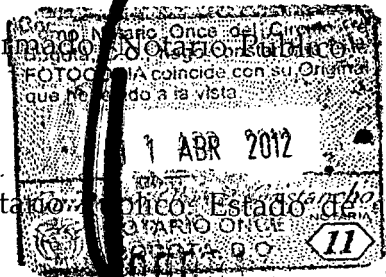
(Firmado)

Fecha: 22 de noviembre de 2010.

Se requiere autenticación

Sello "Suscrito y juramentado ante mí, este día 22 de noviembre de 2010, Notario Público del Condado de McHenry, Estado de Illinois. (Firmado) [Firma] Mi comisión vence el 28 de junio de 2014".

Sello rectangular: "Sello Oficial. Marcia L. Harding. Notario Público del Estado de Illinois. Mi nombramiento vence el 28 de junio de 2014"



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minutista

Apostilla Adjunta:

El Estado de Maryland
Oficina del Secretario de Estado
APOSTILLE
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: Robert P. Duckworth

3. Actuando en calidad de: Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel

4. Lleva el sello/estampilla de: Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel.

Certificado

5. En: Annapolis, Maryland

6. El: Día 6 de diciembre de 2010

7. Por: Secretario del Estado de Maryland

8. Sello: "Sello de la Oficina del Secretario de Estado, Maryland".

9. Firma: (Firmado) Secretario de Estado

No. 270203

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Baxter Healthcare S.A. - Autenticación Maryland"

Fecha: 16 de diciembre de 2010.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

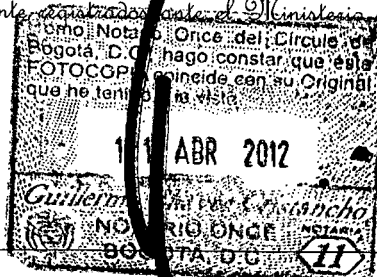
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: treseser1@yahoo.com

Traducción # 15-776



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

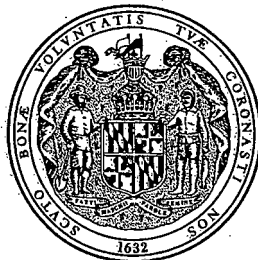
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

630131

Jorge Sierra
CUYA FIRMA APODECE
DOCUMENTO DESEMPLEO
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2010 DIC 5:27
JEFE DE ORGANIZACIONES
BOGOTA D.C.

Como Notario Once del Circuito de
Bogotá D.C. hago constar que esta
FOTOCOPIA coincide con su Original
o he tenido a la vista.
11 ABR 2012
Guilherme Chiriz Cristancho
NOTARIO ONCE NOTARIA
BOGOTÁ D.C.



The State of Maryland

Office of the Secretary of State

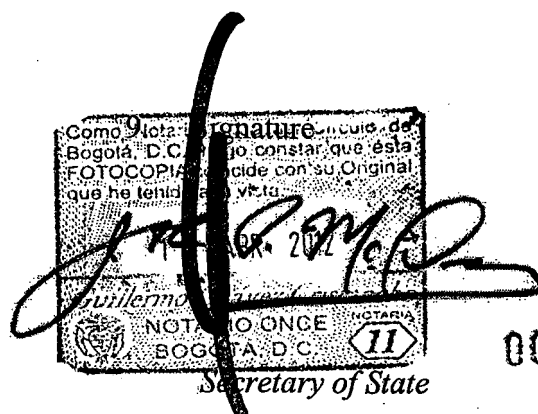
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by **Robert P. Duckworth**
3. acting in the capacity of **Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County**
4. bears the seal/stamp of the **Circuit Court for Anne Arundel County**

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the **6th day of December, 2010**
7. by The Secretary of State of Maryland
8. Seal



000315

No. 270202

To All To Whom These Presents Shall Come
Based upon available information

US Legalization

Authenticates that the attached document signed by

James D. Smith

notarized by

Marcia L. Harding

is true and accurate

Deborah Campbell

Deborah Campbell

Authorized Signature

On this day of December 6th, 2010, I, Ahmad Miski, Notary Public, Anne Arundel County, State of Maryland, do hereby certify under the Oath of my Office and Seal that the signature of Deborah Campbell is true and correct.

My commission expires on May 28th, 2013

97201

State of Maryland, Anne Arundel County, Sec.

I, ROBERT P. DUCKWORTH, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that Ahmad Miski was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 5th day of May, 2009.

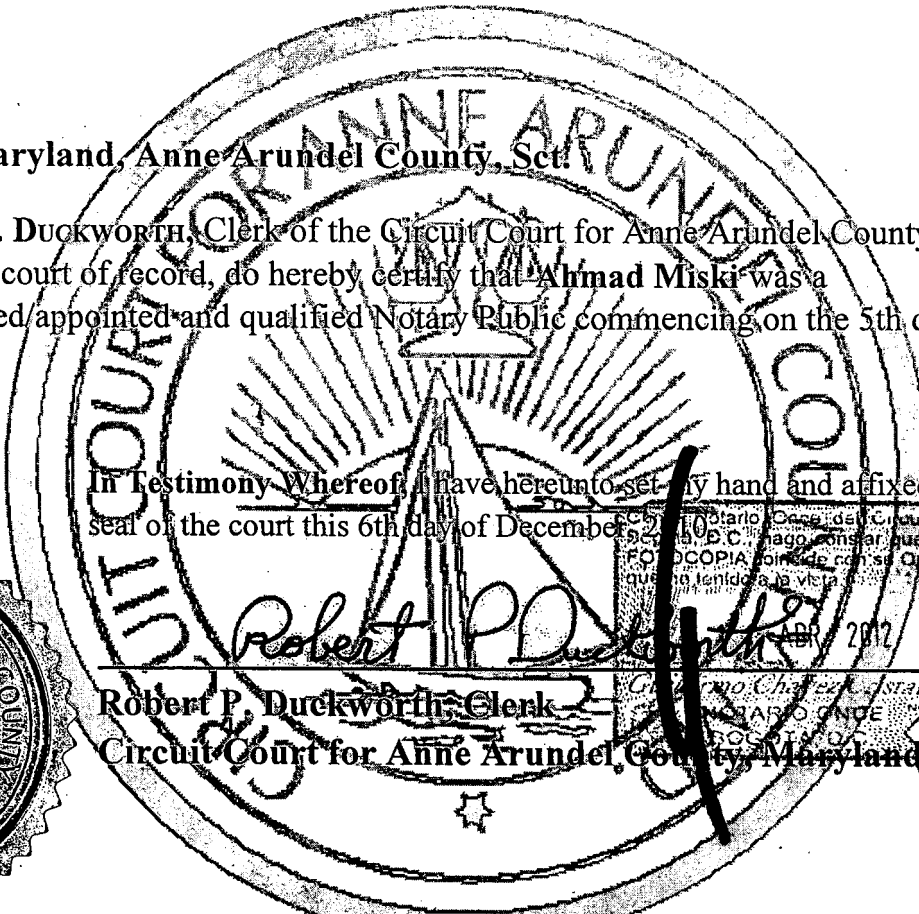
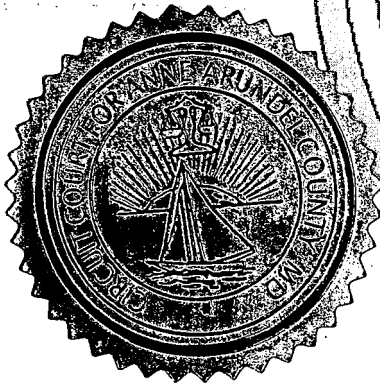
In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court this 6th day of December 2010.

Robert P. Duckworth

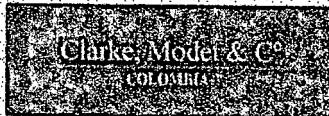
Robert P. Duckworth, Clerk

Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland

000017



17



COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodel.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de Delaware, Estados Unidos de América

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos de América.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales, marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen, así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento, así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía, en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

[Signature]

Firma / Signature
Name / Title:

Subscribed and sworn before me, this 22 day of November, 2010, at Deerfield, Illinois, a Notary Public in and for McHenry County, State of Illinois.

[Signature]
(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28 2014

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

an organization existing under the laws of State of Delaware, United States of America

and in present execution of its business activity, domiciled One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, United States of America.

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties, Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Deerfield, IL, USA
on this 22 day of November 2010



STATEMENT

I, James D. Smith, as legal representative of **BAXTER INTERNATIONAL INC.** in my capacity of Assoc. General & Chief IP Counsel state that **BAXTER INTERNATIONAL INC.** is duly organized in the State of Delaware, USA, existing and addressed in **One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, USA** and I am duly authorized to sign on its behalf in Industrial Property matters and to grant Power of Attorney to third parties, in accordance with the above mentioned position and by delegation of authority under the **Designation of Authority** of said entity, taken on the day of **20 May 2010** in the city of Deerfield, Illinois, USA.

Name: James D. Smith

Title: Assoc. General & Chief IP Counsel

GRANTOR/ APPLICANT: **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

SIGNATURE:

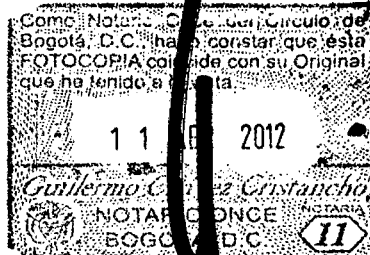
James D. Smith

DATE: Nov. 22, 2010

NOTARIZATION REQUIRED

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2010, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of Illinois

Marcia L. Harding
(Signature)
NOTARY PUBLIC
My Commission expires Jan 28, 2014



A todos los que vieren el presente documento
con base en la información disponible
LEGALIZACIONES DE LOS ESTADOS UNIDOS
Autentica que el documento adjunto firmado por
James D. Smith
protocolizado por
Marcia L. Harding
Es auténtica y correcta

(Firmado) Deborah Campbell. Firma autorizada.

Este día 6 de diciembre de 2010, yo, Ahmad Miski, Notario Público del Condado de Anne Arundel, Estado de Maryland, certifico bajo juramento en mi Oficina y con mi Sello que la firma de Deborah Campbell es auténtica y correcta.

(Firmado) Mi comisión vence el 28 de mayo de 2013.

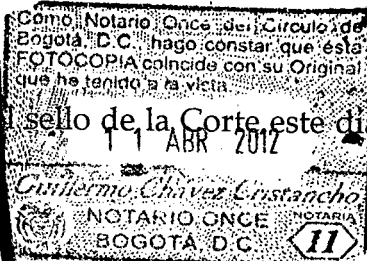
97201

Estado de Maryland, Condado de Anne Arundel, Sct.

Yo, Robert P. Duckworth, Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel, Maryland, una corte de registro, certifico por el presente que Ahmad Miski fue comisionado/nombrado y certificado Notario Público a partir del día 5 de mayo de 2009.

En constancia de lo anterior, he firmado y puse el sello de la Corte este día 6 de diciembre de 2010.

(Firmado) Robert P. Duckworth, Registrador



000020

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Corte del Circuito del Condado de Anne Arundel, Maryland.

Hay un sello de la Corte del Condado.

DECLARACIÓN

"Yo, James D. Smith, como Representante Legal de BAXTER INTERNATIONAL INC., en mi calidad de Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP, declaro que BAXTER INTERNATIONAL INC., está debidamente organizada en el Estado de California, Estados Unidos, existente y con dirección en One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos y estoy debidamente autorizado para firmar en su nombre en asuntos de propiedad industrial y para otorgar Poder a terceros, de acuerdo con el cargo anteriormente mencionado y por resolución de los Estatutos de Constitución de dicha entidad, tomados el día 20 de mayo de 2010 en la ciudad de Deerfield, Illinois, Estados Unidos.

Nombre: James D. Smith

Cargo: Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP

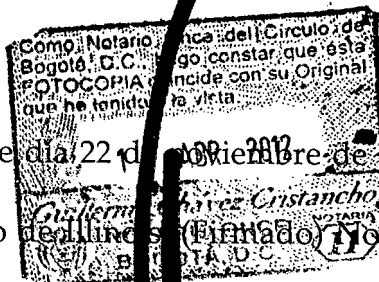
Otorgante/Solicitante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

(Firmado)

- Fecha: 22 de noviembre de 2010.

Se requiere autenticación

Sello "Suscrito y juramentado ante mí, este día 22 de noviembre de 2010, Notario Público del Condado de McHenry, Estado de Illinois (Firmado) Notario Público. Mi comisión vence el 28 de junio de 2014".



Sello rectangular: "Sello Oficial. Marcia L. Harding. Notario Público, Estado de Illinois. Mi nombramiento vence el 28 de junio de 2014"

000021

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

21

Apostilla Adjunta:

El Estado de Maryland
Oficina del Secretario de Estado
APOSTILLE
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: Robert P. Duckworth

3. Actuando en calidad de: Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel

4. Lleva el sello/estampilla de: Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel.
Certificado

5. En: Annapolis, Maryland

6. El: Día 6 de diciembre de 2010

7. Por: Secretario del Estado de Maryland

8. Sello: "Sello de la Oficina del Secretario de Estado, Maryland".

9. Firma: (Firmado) Secretario de Estado

No. 270202

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Certificación:
Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.
Documento: "Baxter International Inc. - Autenticación Maryland"
Fecha: 16 de diciembre de 2010.
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma del Traductor en el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia
Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.
Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.
E-mail: tresereser1@yahoo.com
Traducción # 15-775



000022

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

B-7-107
71

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Jeffrey W. Bullock

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

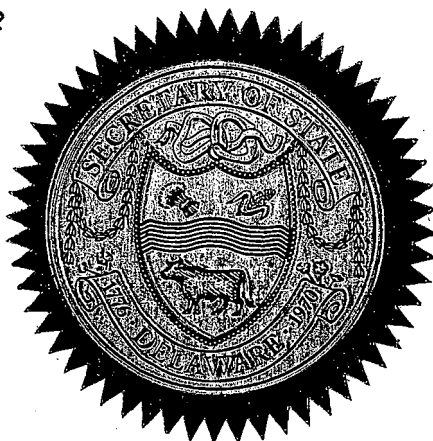
5. at Dover, Delaware

6. the sixth day of July, A.D. 2011

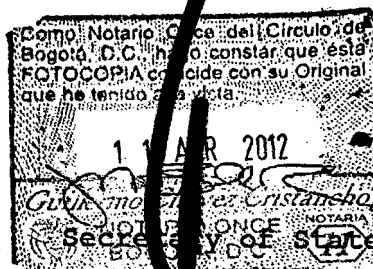
7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0445742

9. Seal/Stamp:



10. Signature:



000023

Delaware

PAGE 1

The First State

I, JEFFREY W. BULLOCK, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "BAXTER INTERNATIONAL INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SIXTH DAY OF JULY, A.D. 2011.



0304913 830

110794965

You may verify this certificate online at corp.delaware.gov/authver.shtml

Jeffrey W. Bullock, Secretary of State
AUTHENTICATION: 8884530 000024

DATE: 07-06-11

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la **APOSTILLA** No. **0445742** de 6 de julio de 2011 expedida en Estados Unidos de América (Delaware) correspondiente a un certificado de vigencia de la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

Jimena
JIMENA ESCOBAR URIBE
 Traductor e Intérprete Oficial
 Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

Delaware
 El Primer Estado

Página 1

Yo, Jeffrey W. Bullock, Secretario de Estado del Estado de Delaware, por medio del presente certifico que "BAXTER INTERNATIONAL INC." está debidamente constituida bajo las leyes del Estado de Delaware y está en vigencia y tiene existencia legal corporativa en cuanto muestran los registros de esta oficina, en este día seis de julio de 2011.

Firmado: Jeffrey W. Bullock, Secretario de Estado

Autenticación: 8884530

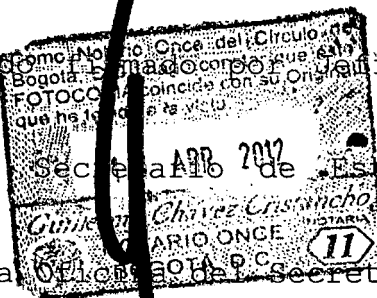
Fecha: 07-06-11

Sello de la Oficina del Secretario, Delaware

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Jeffrey W. Bullock
3. Actuando en su capacidad de Secretario de Estado de Delaware
4. Lleva el sello/estampilla de la Oficina del Secretario de Estado



000025

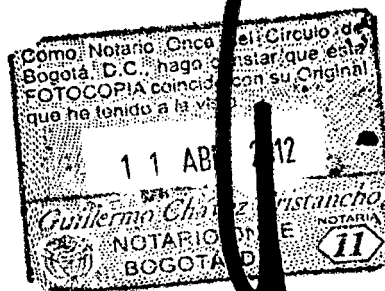
CERTIFICADO

5. En Dover, Delaware
6. El 6 de julio de 2011
7. Por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0445742
9. Sello: sello de la Oficina del Secretario de Estado de Delaware
10. Firma: Firma ilegible, Secretario de Estado

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
 Traductor e Intérprete Oficial
 Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

**MINISTERIO DE
 RELACIONES EXTERIORES**
 2011 JUL 14 A 10:01
[Firma]
JEFE DE LEGALIZACIONES
 BOGOTÁ D.C.

**NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD
 DEL TEXTO**
 081611
Juana Echeb
 CUYA FIRMA APARECE EN EL
 DOCUMENTO DESEMPEÑA
 LAS FUNCIONES INDICADAS



000026

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan en la presente co-formulaciones estables de
inmunoglobulina e hialuronidasa que son estables al
almacenamiento en forma líquida a temperatura ambiente por al
menos 6 meses y a temperaturas estándar de refrigeración por 1-2
años. Tales co-formulaciones pueden usarse en métodos para el
tratamiento de enfermedades o afecciones tratables con IG por
administración subcutánea.

000027

75

CO-FORMULACIÓN ESTABLE DE HIALURONIDASA E INMUNOGLOBULINA, Y

MÉTODOS DE SU USO

CAMPO DE LA INVENCION

5 Se proporcionan en la presente co-formulaciones estables de
inmunoglobulina y hialuronidasa que son estables para
almacenamiento en forma líquida a temperatura ambiente durante al
menos 6 meses y a temperaturas de refrigeración estándar por 1-2
años. Tales co-formulaciones se pueden usar en métodos para el
10 tratamiento de enfermedades o afecciones tratables con IG por
administración subcutánea.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los productos de inmunoglobulina (IG) de plasma humano se
15 usaron primero en 1952 para tratar deficiencia inmunitaria.
Inicialmente, las administraciones intramuscular o subcutánea de
IG fueron los métodos de elección. Para inyectar grandes
cantidades de IG necesarias para tratamiento efectivo de diversas
enfermedades, sin embargo, los productos administrables de forma
20 intravenosa con IG concentrado menor (50 mg/mL) se desarrollaron.
La administración intravenosa (IV) de inmunoglobulina (IVIG) es
el tratamiento primario de individuos con inmunodeficiencias.
Aunque las preparaciones IVIG iniciales causan severos efectos
secundarios, las preparaciones IVIG disponibles actualmente son
bien toleradas en la mayoría de pacientes con deficiencia
inmunológica. No obstante, una pequeña porción de pacientes
continúa teniendo reacciones desagradables, aún discapacitantes
tal como dolor de cabeza, fatiga, y mialgia. La fiebre y

000978

escalofríos sigue siendo un problema, especialmente cuando los pacientes tienen infecciones intercurrentes. Las reacciones frecuentemente persisten a pesar de tratar otras preparaciones IVIG o pre-medicar con acetaminofeno, difenhidramina, y corticosteroides. Además, debido al requisito para administración IV, hay problemas con el apego del paciente.

La administración subcutánea (SQ) de inmunoglobulina es una alternativa para administración intravenosa. Comparado con infusiones IV, la administración SQ de inmunoglobulina tiene diversas ventajas. Por ejemplo, se reduce la incidencia de reacciones sistémicas, no requiere el acceso IV algunas veces difícil, mejora los niveles mínimos, y da a los pacientes una mayor independencia.

Para uso terapéutico de cualquier preparación IG, otra consideración importante en los productos IG es su estabilidad durante el almacenamiento. El manejo seguro y la administración de formulaciones que contienen proteínas representan importantes desafíos a los formuladores farmacéuticos. Las proteínas poseen propiedades químicas y físicas únicas que presentan problemas de estabilidad: una variedad de trayectorias de degradación existen para proteínas, que implican tanto inestabilidad química como física. La inestabilidad química incluye desaminación, agregación, recorte de la estructura de péptido, y oxidación de residuos de metionina. La inestabilidad física abarca muchos fenómenos, incluyendo, por ejemplo, agregación. Por lo tanto, hay una necesidad para formulaciones estables de preparaciones de inmunoglobulina.

000029

SUMARIO DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente composiciones, métodos y kits para administración subcutánea de co-formulaciones líquidas, estables para tratar enfermedades y afecciones tratables con IG.

- 5 Se proporcionan composiciones de co-formulación líquida, estable formuladas para administración subcutánea, que contienen inmunoglobulina (IG) en una concentración que es al menos 10% p/v, una hialuronidasa soluble en una concentración que es al menos 50 U/mL y se presenta en una relación de al menos 100
- 10 Unidades/gramo (U/g) IG, NaCl en una concentración de al menos 50 mM y un pH de entre 4 hasta 5. La co-formulación es estable en 28°C-32°C durante al menos 6 meses.

- Además, un estabilizador de aminoácido se puede presentar, por ejemplo, alanina, histidina, arginina, lisina, ortinina,
- 15 isoleucina, valina, metionina, glicina o prolina. En algunos ejemplos, el aminoácido se presenta en una cantidad que es al menos 100 mM. En un ejemplo, el aminoácido es glicina y se presenta en una cantidad que es o es al menos 100 mM, 150 mM, 200
- 20 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM o más. En otro ejemplo, la glicina está en una cantidad que es 250 mM.

Las co-formulaciones líquidas, estables proporcionadas en la presente contienen IG al menos 10% hasta 22%, por ejemplo 10% en p/v, 11% en p/v, 12% en p/v, 13% en p/v, 14% en p/v, 15% en p/v, 16% en p/v, 17% en p/v, 18% en p/v, 19% en p/v, 20% en p/v, 21% en p/v, 22% en p/v o más. En algunos ejemplos, el IG es 10% en p/v o 20% en p/v. El IG usado en las co-formulaciones es desde plasma humano, por ejemplo, se puede purificar de plasma humano tal como por fraccionamiento de alcohol. En algunos ejemplos, el

000030

IG se purifica además por uno de cualesquiera de una modificación química, incubación en pH 4.0 con o sin pepsina, precipitación de polietilenglicol (PEG), cromatografía de intercambio de iones, escisión enzimática, tratamiento de solvente/detergente, 5 diafiltración o ultrafiltración. Las co-formulaciones proporcionadas en la presente pueden emplear IG que contiene IgG, IgA e IgM. En algunos ejemplos, el IG contiene mayor que IgG al 95%.

Además, las co-formulaciones pueden contener NaCl. En 10 algunos ejemplos, el NaCl está en una concentración de 50 mM hasta 220 mM, por ejemplo, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM o más. En un ejemplo, el NaCl está en una concentración de 150 mM.

15 Las co-formulaciones proporcionadas en la presente contienen una hialuronidasa soluble que puede ser PH20, o una forma truncada de la misma. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede ser una PH20 humana truncado o bovino, ovino. En algunos ejemplos donde la PH20 es una PH20 humana truncada, la PH20 humana 20 truncada se puede seleccionar de entre polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-9, o variantes alélicas u otras variantes de los mismos. En un ejemplo, la hialuronidasa soluble es rHuPH20.

Además, la hialuronidasa soluble puede estar en una concentración que es 50 U/mL hasta 500 U/mL, por ejemplo 50 U/mL, 100 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/ mL o más. Por ejemplo, la hialuronidasa soluble puede estar en una concentración que es 100 U/mL o 300 U/mL. En las co-formulaciones

000031

proporcionadas en la presente, la hialuronidasa soluble se puede presentar en una relación de 100 U/g IG hasta 5000 U/g IG, por ejemplo, 100 U/g IG, 150 U/g IG, 200 U/g IG, 250 U/g IG, 300 U/g IG, 400 U/g IG, 500 U/g IG, 600 U/g IG, 700 U/g IG, 800 U/g IG, 900 U/g IG, 1000 U/g IG, 1200 U/g IG, 1500 U/g IG, 1800 U/g IG, 2000 U/g IG, 3000 U/g IG, 4000 U/g IG, 5000 U/g IG o más. En algunos ejemplos la hialuronidasa soluble está en una relación de 500 U/g IG, 1000 U/g IG, 1500 U/g IG o 3000 U/g IG. El pH de las co-formulaciones pueden ser 4.4 hasta 4.9 en forma concentrada.

Las co-formulaciones proporcionadas en la presente se pueden formular por administración de múltiples dosis o administración de dosis única. Además, en los ejemplos donde la co-formulación es para administración de dosis única, el IG está en una cantidad suficiente para tratar una enfermedad o afección tratable con IG.

El IG se puede administrar diariamente, semanalmente, bisemanalmente, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente para el tratamiento de una enfermedad o afección tratable con IG.

La administración de la co-formulación se efectúa tal que la cantidad de IG administrada es substancialmente la misma como la cantidad en una administración de dosis única cuando se administra intravenosamente para el tratamiento de una enfermedad o afección tratable con IG. En algunos ejemplos la cantidad de IG en la co-formulación puede ser alrededor de 1 gramo (g) hasta 200 g, por ejemplo, 1 gramo (g), 2 g, 3 g, 4 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g. Además, la cantidad de hialuronidasa en la composición puede ser alrededor de 500 Unidades hasta 100,000 Unidades, por ejemplo, 500 Unidades, 1000 Unidades, 2000 Unidades, 5000 Unidades, 10,000

Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades,
60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000
Unidades, 100,000 Unidades o más.

Las co-formulaciones líquidas que se proporcionan en la
5 presente son estables a 28°-32°C durante al menos 6 meses hasta
un año, por ejemplo, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10
meses, 11 meses, 12 meses o más. Las co-formulaciones líquidas
son además estables en 0°C-10°C durante al menos 6 meses hasta 2
años, por ejemplo, 6 meses, 1 año, 2 años o más.

10 También se proporciona en la presente un kit que contiene
cualquiera de las co-formulaciones líquidas, estables
proporcionadas en la presente, y opcionalmente instrucciones para
el uso.

Se proporcionan en la presente recipientes que contienen las
15 co-formulaciones líquidas, estables proporcionadas en la
presente. El recipiente puede ser un tubo, botella, vial o
jeringa. En ejemplos donde el recipiente es una jeringa, el
recipiente además comprende una aguja para inyección. Por lo
tanto, los recipientes proporcionadas en la presente contienen
20 las co-formulaciones líquidas, estables para la administración de
dosis única o administración de múltiples dosis.

Se proporcionan en la presente métodos para tratar
enfermedades o afecciones tratables con IG, al administrar
subcutáneamente a un sujeto una co-formulación líquida, estable
que contiene una hialuronidasa soluble e IG. La co-formulación se
administra tal que la cantidad de IG administrada es
substancialmente la misma como la cantidad cuando se administra
intravenosamente para el tratamiento de una enfermedad o afección

000133

tratable con IG.

Además, los métodos se proporcionan en la presente para tratar una enfermedad o afección tratable con IG, seleccionada de entre enfermedades de deficiencia inmunitaria primaria, 5 enfermedades de deficiencia inmunitaria secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes e infecciones agudas.

En algunos ejemplos, las co-formulaciones se pueden administrar usando los métodos proporcionados en la presente para tratar una enfermedad de deficiencia inmunitaria primaria. La 10 enfermedad de deficiencia inmunitaria primaria puede ser inmunodeficiencia variable común (CVID), deficiencia IgA selectiva, deficiencia de subclases IgG, deficiencia de anticuerpo específico, trastornos de complemento, agammaglobulinemia congénita, ataxia telangiectasia, hiper IgM, 15 síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpo, Agammaglobulinemia ligado a X (XLA), o hipogammaglobulinemia de infancia.

20 En otros ejemplos, la afección o enfermedad tratable con IG es una enfermedad de deficiencia inmunitaria adquirida secundaria a neoplasias hematológicas. La neoplasia hematológica se puede seleccionar de entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de no Hodgkin (NHL).

En instancias donde la afección o enfermedad tratable con IG es una enfermedad inflamatoria o autoinmune, la enfermedad inflamatoria o autoinmune se puede seleccionar de entre enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante

000034

inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barre, púrpura trombocitopénica idiopática, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpo de inclusión, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuropatía motora multifocal, miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltman.

En algunos ejemplos la co-formulación se administra para tratar una infección bacteriana, viral o fúngica aguda, tal como, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; estreptococos de grupo B; *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23; adenovirus tipos 2 y 5; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr VCA; virus de hepatitis A; virus de hepatitis B; virus del herpes simple 1; virus del herpes simple 2; influenza A; sarampión; parainfluenza tipos 1, 2 y 3; polio; virus de varicela zoster; *Aspergillus*; y *Candida albicans*.

Además, la afección o enfermedad tratable con IG se puede seleccionar de entre inmunodeficiencia iatrogénica; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica positiva ANCA; anemia hemolítica autoinmunitaria; penfigoide bulloso; penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmune); trombocitopenia aloinmune feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de célula madre hematopoyético alogénico de alto riesgo; neuropatía paraproteinémica IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica opsoclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura de post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de choque

000335

tóxico; Enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; sepsia; tumores de célula B; degeneración cerebelosa paraneoplásica sin anticuerpos; y trasplante de médula ósea.

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Perfil

A. Definiciones

B. Co-formulaciones estables de Inmunoglobulina (IG) e

10 hialuronidasa

1. Terapia de Inmunoglobulina

2. Administración Subcutánea de Formulaciones de Inmunoglobulina e Hialuronidasa

3. Co-formulaciones Estables

15 C. Inmunoglobulina y Preparación de Inmunoglobulina

1. Preparación y Purificación

a. Método Cohn-Oncley

b. Procedimientos Cohn-Oncley Modificados

c. Procesamiento viral

20 d. Concentración de Proteína

e. Preparaciones IG Ejemplares

i. IG al 10%

ii. Preparaciones IG de Alta Concentración

(por ejemplo IG al 20%)

2. Estabilidad de Almacenamiento

a. Excipientes de Estabilización de Proteína

b. pH

D. Hialuronidasa

000036

1. PH20

2. Hialuronidasa Soluble

a. PH20 Soluble Humana

b. PH20 Humana Recombinante Soluble (rHuPH20)

5 3. Glicosilación

4. Modificación de hialuronidasas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos que codifican una Hialuronidasa soluble y Polipéptidos De los mismos

10 1. Vectores y Células

2. Expresión

a. Células Procarióticas

b. Células de Levadura

c. Células de Insecto

15 d. Células de Mamífero

e. Plantas

3. Técnicas de Purificación

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

20 1. Formulaciones y Dosificaciones

a. Inmunoglobulina

b. Hialuronidasa

c. Cloruro de sodio

d. Estabilizador de Aminoácido

e. Otros Agentes

2. Formas de Dosificación

3. Administración

G. Métodos de Evaluación de la Actividad, Estabilidad,

000037

Biodisponibilidad y Farmacocinética

- 1. Tamaño Molecular
- 2. Actividad Biológica
 - a. Inmunoglobulina

5

- b. Hialuronidasa

- 1. Farmacocinética y tolerabilidad

H. Métodos de Tratamiento y Usos Terapéuticos

- 1. Deficiencia inmunitaria Primaria y Secundaria
 - a. Deficiencia inmunitaria primaria
 - b. Deficiencia inmunitaria secundaria

10

- 2. Enfermedades Inflamatorias y Autoinmunitarias
 - a. Enfermedad de Kawasaki
 - b. Polineuropatía desmielinizante inflamatoria

crónica

15

- c. Síndrome de Guillain-Barre
- d. Púrpura trombocitopénica idiopática
- e. Miopatías inflamatorias
 - i. Dermatomiositis
 - ii. polimiositis
 - iii. miositis por cuerpo de inclusión
- f. Síndrome miasténico de Lambert-Eaton
- g. Neuropatía motora multifocal
- h. Miastenia Gravis
- i. Síndrome de Moersch-Woltmann

20

- 3. Infecciones Agudas
- 4. Otra Enfermedad y Afecciones

I. Artículos de fabricación y kits

J. Ejemplos

000038

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 uno de experiencia en la técnica a los cuales la invención pertenece. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de Genbank, bases de datos, sitios web y otros materiales publicados referidos a lo largo de la descripción completa en la presente, a menos que se anote de otra manera, se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que hay una pluralidad de definiciones para términos en la presente, aquellos en esta sección prevalecen. Cuando se hace referencia a una URL o cualquier otro 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 al buscar en el internet. Evidencias de referencia de los mismos, la disponibilidad y difusión pública de tal información.

Como se usa en la presente, "inmunoglobulina," "globulina inmunitaria," "globulina gamma" se refiere a preparaciones de proteínas de plasma derivadas del plasma combinado de donantes adultos. Los anticuerpos IgG predominantes; otras subclases de anticuerpo, tal como IgA y IgM se presentan. La inmunoglobulina terapéutica puede proporcionar inmunización pasiva al incrementar niveles de suero en el receptor de anticuerpos circulantes. Los anticuerpos IgG pueden, por ejemplo, enlazar a y neutralizar toxinas bacterianas; opsonizar patógenos; complemento activado; y

000039

citocinas patogénicas suprimidas y fagocitos a través de interacción con citocinas y receptores de los mismos, tal como CD5, interleucina-1a (IL-1a), interleucina 6 (IL-6), factor alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa), y receptores de célula T. La inmunoglobulina terapéutica puede inhibir la actividad de autoanticuerpos. Las preparaciones de inmunoglobulina también incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina IV, inmunoglobulina terapéutica. Las preparaciones de inmunoglobulina son bien conocidas, e incluyen nombres comerciales, tal como BayGam®, Gamimune® N, Gammagard® S/D, Gammar®-P, Iveegam® EN, Panglobulin®, Polygam® S/D, Sandoglobulin®, Venoglobulin®-I, Venoglobulin®-S, WinRho® SDF y otros. Las preparaciones de inmunoglobulina pueden ser derivadas de plasma humano, o se producen recombinantemente.

Como se usa en la presente, "IgG intravenosa" o tratamiento de "IVIG" se refiere generalmente a un método terapéutico de administrar intravenosamente una composición de inmunoglobulinas de IgG a un paciente para tratar un número de afecciones tal como inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes. Las inmunoglobulinas de IgG se agrupan típicamente y preparan de plasma. Todos los anticuerpos o fragmentos se pueden usar.

Como se usa en la presente, las enfermedades o afecciones tratables con IG se refieren a cualquier enfermedad o afección para la cual las preparaciones de inmunoglobulina se usan. Tales enfermedades y afecciones, incluyen, pero no se limitan a, cualquier enfermedad en la cual un aumento en anticuerpos circulantes es mejorador, tal como, por ejemplo,

000040

inmunodeficiencia; hipogammaglobulinemia adquirida secundaria a
 neoplasias hematológicas; enfermedad de Kawasaki; polineuropatía
 desmielinizante inflamatoria crónica (CEDP); Síndrome de
 Guillain-Barre; Púrpura trombocitopénica idiopática; miopatías
 5 inflamatorias; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; neuropatía
 motora multifocal; Miastenia Gravis; síndrome de Moersch-
 Woltmann; hipogammaglobulinemia secundaria (incluyendo
 inmunodeficiencia iatrogénica); deficiencia de anticuerpo
 específico; Encefalomiелitis diseminada aguda; Vasculitis
 10 necrotizante sistémica positiva ANCA; Anemia hemolítica
 autoinmunitaria; Penfigoide bulloso; Penfigoide cicatricial;
 síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria
 con trombocitopenia inmune); Trombocitopenia aloinmune feto-
 maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); Síndrome hemofagocítico;
 15 Trasplante de célula madre hematopoyético alogénico de alto
 riesgo; Neuropatía paraproteinéica IgM; trasplante de riñón;
 esclerosis múltiple; Ataxia mioclónica opsoclónica; Pénfigo
 foliáceo; Pénfigo vulgar; Púrpura de post-transfusión; Necrolisis
 epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); Síndrome
 20 de choque tóxico; Enfermedad de Alzheimer; Lupus eritematoso
 sistémico; mieloma múltiple; sepsia; Tumores de célula B; trauma;
 y una infección fúngica o viral bacteriana.

Como se usa en la presente, temperatura ambiente se refiere
 a un intervalo generalmente desde alrededor de 0 a 18°C hasta
 alrededor de 0 a 32°C. Aquellos de experiencia en la técnica
 aprecian que la temperatura ambiente varía por ubicación y que
 prevalece en las afecciones. Por ejemplo, temperaturas ambiente
 puede ser mayor en climas más cálidos tal como Italia ^{Texas} 000541

Como se usa en la presente, "estable" o "estabilidad" con referencia a una co-formulación proporcionada en la presente se refiere a una en la cual las proteínas (IG y hialuronidasa) de la misma esencialmente mantienen su estabilidad física y química e integridad sobre el almacenamiento durante al menos seis meses a temperaturas hasta 32°C. Para propósitos de la presente, "estabilidad a temperatura ambiente" significa estabilidad en el intervalo superior de temperaturas ambiente típicas para lugares más cálidos (esto es, 28-32°C para Italia o Texas). Las formulaciones son estables sobre el intervalo de temperaturas ambiente y de refrigeración, esto es, 0 - 32°C, o hasta 32°C durante al menos seis meses. Cada uno del IG y la hialuronidasa exhiben estabilidad en la co-formulación sobre el almacenamiento durante al menos seis meses a temperatura ambiente, incluyendo temperaturas hasta en o alrededor de 32°C. Los ensayos para evaluar la estabilidad de cada uno son bien conocidos por uno de experiencia en la técnica y se describen en la presente.

Como se usa en la presente, la estabilidad de IG significa que el IG no agrega sustancialmente, desnaturaliza o fragmenta tal que al menos 90% del IG se presenta como monómeros u oligo-/dímeros, con un peso molecular de IG de entre en o alrededor de mayor que 70 kDa y menos de < 450 kDa. Por lo tanto, menos de alrededor de 10%, por ejemplo, menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3%, menos de alrededor de 2%, menos de alrededor de 1% de la proteína IG se presenta como un agregado (esto es, tiene un tamaño molecular mayor que o igual a 450 kDa en tamaño) en la formulación. De forma similar, no más de 5% hasta 7%, por ejemplo, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0.5%.

000042

menos del IG en la co-formulación se fragmenta (esto es, tiene un tamaño molecular menos de 70 kDa).

Como se usa en la presente, la estabilidad de la hialuronidasa significa que mantiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la actividad de hialuronidasa original antes del almacenamiento. Los ensayos para evaluar la actividad de hialuronidasa son conocidos por uno de experiencia en la técnica y se describen en la presente.

Como se usa en la presente, "almacenamiento" significa que una formulación no se administra inmediatamente a un sujeto una vez preparado, pero se mantiene por un periodo de tiempo bajo afecciones particulares (por ejemplo, temperatura particular; forma líquida o liofilizada) antes de usar. Por ejemplo, una formulación líquida se puede mantener por días, semanas, meses o años, generalmente al menos seis meses, antes de la administración a un sujeto bajo temperaturas variadas tal como temperatura refrigerada (0° hasta 10°C) o ambiente (por ejemplo, temperatura hasta 32°C).

Como se usa en la presente, régimen de dosificación se refiere a la cantidad de inmunoglobulina administrada y la frecuencia de administración. El régimen de dosificación es una función de la enfermedad o afección a tratarse, y por lo tanto puede variar.

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

000043

dosis IV o frecuencia. Las cantidades de IVIG que son efectivas para tratar una enfermedad o afección particular se conocen o pueden ser determinadas empíricamente por uno de experiencia en la técnica. Por ejemplo, como se ejemplifica abajo, 300 mg/kg (esto es, 21 gramos asumiendo los pesos de adulto promedio 70 kg) hasta 600 mg/kg (esto es, 42 gramos) es la dosis mensualmente típica de IVIG administrado a pacientes que tienen enfermedades de inmunodeficiencia primaria. Por lo tanto, IG, cuando se administra en combinación con hialuronidasa, se administra subcutáneamente en dosis que son o están alrededor de 300 mg/kg hasta 600 mg/kg para el tratamiento de enfermedades de inmunodeficiencia primaria.

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

Como se usa en la presente, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada ácido hialurónico. Las hialuronidasas incluyen las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos (EC 3.2.1.36), e hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35). Las hialuronidasas también incluyen cualquiera de origen no humano que incluye, pero no se limita a, murino, canino, felino, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, de peces, de ranas, bacteriano, y cualquiera de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos. Las Hialuronidasas no humanas ejemplares incluyen, hialuronidasas de

000044

vacas (SEQ ID NOS: 10 y 11), avispa de chaqueta amarilla (SEQ ID NOS: 12 y 13), miel de abeja (SEQ ID NO: 14), avispón de cara blanca (SEQ ID NO: 15), avispa de papel (SEQ ID NO: 16), ratón (SEQ ID NOS: 17-1, 32), cerdo (SEQ ID NOS: 20-21), rata (SEQ ID NOS: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO: 25), oveja (SEQ ID NOS: 26 y 27), orangután (SEQ ID NO: 28), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), conejillos de indias (SEQ ID NO: 30), *Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO: 33), *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 34), y *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO: 35). Las hialuronidasas también incluyen aquellas de origen humano. Las hialuronidasas humanas ejemplares incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 36), HYAL2 (SEQ ID NO: 37), HYAL3 (SEQ ID NO: 38), HYAL4 (SEQ ID NO: 39), y PH20 (SEQ ID NO: 1). También incluidas entre hialuronidasas son hialuronidasas solubles, incluyendo, PH20 de ovino y bovino, PH20 soluble humana y rHuPH20 soluble.

La referencia a hialuronidasas incluye polipéptidos de hialuronidasa precursores y polipéptidos de hialuronidasa maduros (tal como aquellos en los cuales una secuencia de señal se ha removido), 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 identidad de secuencia a los polipéptidos precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 1 y 10-39, o la forma madura de los mismos. Por ejemplo, referencia a hialuronidasa también incluyen las variantes de polipéptido precursor de PH20 humana establecidos en las SEQ ID NOS: 50-51. Las hialuronidasas también

000045

45
incluyen aquellas que contienen modificaciones químicas o postraduccionales y aquellas que no contienen modificaciones químicas o postraduccionales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación, albuminación, glicosilación, farnesilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y
5 otras modificaciones de polipéptido conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente, una hialuronidasa soluble se refiere a un polipéptido caracterizado por su solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Generalmente, una hialuronidasa soluble
10 carece de toda o una parte de una ancla de glicofosfatidilo (GPI), o de lo contrario no suficientemente ancla a la membrana celular. Por lo tanto, sobre la expresión de una célula, una hialuronidasa soluble se secreta en el medio. Las hialuronidasas solubles se pueden distinguir, por ejemplo, por su distribución
15 en la fase acuosa de una solución de Triton X-114 entibiada a 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256: 1604-7). El anclado a la membrana, tal como hialuronidasas ancladas a lípido, se dividirá en la fase rica en detergente, pero se dividirá en la fase acuosa o pobre en detergente que sigue del tratamiento con
20 Fosfolipasa-C. Incluidas entre hialuronidasas solubles son membranas ancladas a hialuronidasas en las cuales una o más regiones asociadas con anclaje de la hialuronidasa a la membrana se ha removido o modificado, donde la forma soluble conserva la actividad de hialuronidasa. Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas solubles recombinantes y aquellas contenidas en o purificadas de fuentes naturales, tal como, por ejemplo, extractos de testículos de oveja o vacas. Ejemplares de tales hialuronidasas solubles son PH20 soluble humana. Otras

000046

hialuronidasas solubles incluyen ovino (SEQ ID NO: 27) y bovino (SEQ ID NO: 11) PH20.

Como se usa en la presente, la PH20 soluble humana o sHuPH20 incluye polipéptidos maduros que carecen de todo o una parte del sitio de enlace de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la terminal C de tal manera que sobre expresión, los polipéptidos son solubles. Los polipéptidos sHuPH20 ejemplares incluyen polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácido establecida en una de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 4-9 y 47-48. Los polipéptidos precursores para tales polipéptidos sHuPH20 ejemplares incluyen una secuencia de señal. Ejemplar de los precursores son aquellos establecidos en las SEQ ID NOS: 3 y 40-46, cada uno de los cuales contiene una secuencia de señal del aminoácido 35 en las posiciones de aminoácido 1-35. Los polipéptidos HuPH20 solubles también incluyen aquellos degradados durante o después de los métodos de producción y purificación descritos en la presente.

Como se usa en la presente, PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20) se refiere a una forma soluble de PH20 humana que se expresa recombinantemente en células de Ovario de Hámster Chino (CHO). La rHuPH20 soluble se codifica por ácido nucleico que incluye la secuencia de señal y se establece en la SEQ ID NO: 49. También se incluyen moléculas de ADN que son variantes alélicas de los mismos y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Como se produce en el medio de cultivo hay heterogeneidad en la terminal C de manera que el producto incluye una mezcla de especies que pueden incluir cualquiera de una o más

000347

de las SEQ ID NOS: 4-9 en diversa abundancia. Las variantes alélicas correspondientes y otras variantes también se incluyen, incluyendo aquellas que corresponden a los polipéptidos PH20 humanos precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 50-51. Otras
5 variantes pueden tener 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-9 y 47-48 mientras que mantienen una actividad de hialuronidasa y son solubles.

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

Como se usa en la presente, la actividad de hialuronidasa se
20 refiere a la capacidad de hialuronidasa para desdoblar ácido hialurónico. Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad de hialuronidasa de hialuronidasas, tal como rHuPH20 soluble, se conocen en la técnica y describen en la presente. Los ensayos ejemplares incluyen el ensayo de microturbiedad descrito abajo (ver por ejemplo, Ejemplo 3) que mide la escisión de ácido hialurónico por hialuronidasa indirectamente al detectar el precipitado insoluble formado cuando el ácido hialurónico desdoblado se enlaza con albumina de suero.

000048

41

Como se usa en la presente, el término "ultrafiltración (UF)" abarca una variedad de métodos de filtración de membrana en los cuales la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semi-permeable. Los sólidos suspendidos y solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el agua y solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este proceso de separación se usa frecuentemente para purificar y concentrar soluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), especialmente soluciones de proteína. Un número de membranas de ultrafiltración están disponibles dependiendo del tamaño de las moléculas retenidas. La ultrafiltración típicamente se caracteriza por un tamaño de poro de membrana entre 1 y 1000 kDa y presiones que funcionan entre 0.01 y 10 bar, y es particularmente útil para separar coloides tipo proteínas de moléculas pequeñas como azúcares y sales.

Como se usa en la presente, el término "diafiltración" se realiza con las mismas membranas como ultrafiltración y es una filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, la solución amortiguadora se introduce en el tanque de reciclado mientras el filtrado se remueve de la operación de unidad. En los procesos donde el producto está en lo retenido (por ejemplo IgG), la diafiltración lava los componentes fuera de la pileta del producto en el filtrado, de este modo intercambiando soluciones amortiguadoras y reduciendo la concentración de especies indeseables.

Como se usa en la presente, el término "mezcla" describe un acto de causar distribución igual de dos o más compuestos distintos o sustancias en una solución o suspensión por

000049

cualquier forma de agitación. La distribución igual completa de todos los ingredientes en una solución o suspensión no se requiere como un resultado de la "mezcla" como el término se usa en esta solicitud.

5 Como se usa en la presente, el término "solvente" abarca cualquier sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más de otras sustancias. Un solvente puede ser inorgánico en naturaleza, tal como agua, o puede ser un líquido orgánico, tal como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo,
10 hexano, éter de petróleo, etc. Como se usa en el término "tratamiento de detergente solvente," el solvente denota un solvente orgánico (por ejemplo, fosfato de tri-N-butilo), que es parte de la mezcla de detergente solvente usado para inactivar virus de envoltura lipídica en la solución.

15 Como se usa en la presente, el término "detergente" se usa en esta solicitud intercambiabilmente con el término "tensoactivo" o "agente que actúa en la superficie." Los tensoactivos son compuestos típicamente orgánicos que son anfifílicos, esto es, que contienen tanto grupos hidrofóbicos
20 ("colas") como grupos hidrofílicos ("cabezas"), que reproducen tensoactivos soluble en tanto solventes orgánicos como agua. Un tensoactivo se puede clasificar por la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensoactivo no iónico no tiene grupos de carga en su cabeza, mientras que un tensoactivo iónico lleva una carga neta en su cabeza. Un tensoactivo zwitteriónico contiene una cabeza con dos grupos opuestamente cargados. Algunos ejemplos de tensoactivos comunes incluyen:
Aniónicos (basados en aniones de sulfato, sulfonato o

000350

carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO),
 perfluorooctanosulfonato (PFOS), dodecil sulfato de sodio (SDS),
 lauril sulfato de amonio, y otras sales de sulfato de alquilo,
 laureth sulfato de sodio (también conocido como lauril éter
 5 sulfato de sodio, o SLES), alquil benceno sulfonato; catiónicos
 (basados en cationes de amonio cuaternario): cetil trimetilamonio
 bromuro (CTAB) a.k.a. bromuro de hexadecil trimetil amonio, y
 otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio
 (CPC), amina de sebo polietoxilado (POEA), cloruro de benzalconio
 10 (BAC), cloruro de benzetonio (BZT); Zwitteriónicos (anfótero):
 betaína de dodecilo; betaína de cocamidopropilo; coco amfo
 glicinato; no iónicos: poli(óxido de etileno) de alquilo,
 poli(óxido de etileno) de alquilfenol, copolímeros de poli(óxido
 de etileno) y poli(óxido de propileno) (comercialmente conocido
 15 como Poloxámeros o Poloxaminas), alquil poliglucósidos,
 incluyendo glucósido de octilo, maltosida de decilo, alcoholes
 grasos (por ejemplo, alcohol de cetilo y alcohol de oleilo),
 cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80,
 etc.), detergentes de Triton, y óxido de dodecil dimetilamina.

20 Como se usa en la presente, los residuos de aminoácidos α
 que se presentan naturalmente son los residuos de aquellos 20
 aminoácidos α encontrados en la naturaleza que se incorporan en
 la proteína por el reconocimiento específico de la molécula tARN
 cargada con su codón mARN cognado en humanos.

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 simple o doble. Cuando se refiere a sondas e

cebadores, que se etiquetan opcionalmente, tal como con una etiqueta detectable, se contemplan tal como moléculas de hebra simple, fluorescente o etiquetada. Tales moléculas son típicamente de una longitud de tal manera que su objetivo es estadísticamente única o de bajo número de copia (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 secuencia complementaria a o idéntica a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser 10 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos largos.

Como se usa en la presente, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene desde 2 hasta 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 con sus abreviaturas conocidas, 15 de una letra o tres letras (Tabla 1). Los nucleótidos que ocurren en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de una sola letra estándar usadas rutinariamente en la técnica.

20 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 de 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

000052

(hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces de péptido. Los
residuos de aminoácido descritos en la presente se suponen para
estar en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma
isomérica "D", que son tan designados, pueden ser sustituidos por
5 cualquier residuo de aminoácido L siempre que la propiedad
funcional deseada se conserva por el polipéptido. NH₂ se refiere
al grupo amino libre presente en el extremo amino de un
polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en
el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la
10 nomenclatura de polipéptido estándar descrita en J. Biol. Chem.,
243: 3557-3559 (1968), y aprobada 37 C.F.R, §§ 1.821-1.822, las
abreviaturas por residuos de aminoácido se muestran en la Tabla
1:

15 Tabla 1 - Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1 Letra	3 Letras	AMINOACIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
20 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

000053

Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteina
X	Xaa	Desconocido u otro

Se debe señalar que 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 extremos amino hasta extremos carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos enlistados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y modificar y aminoácidos inusuales, tal como aquellos referidos en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en la presente por referencia. Además, se debe señalar que un poco al principio o al final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un enlace de péptido a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido, a un grupo de terminal amino tal como NH₂ o a un grupo de terminal carboxilo tal como COOH.

Como se usa en la presente, "aminoácidos que se presentan naturalmente" se refieren a los aminoácidos 20 L que ocurren en polipéptidos.

Como se usa en la presente, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos que no se presentan naturalmente por lo tanto

000354

5 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 D-isoesterómeros de aminoácidos. Aminoácidos ejemplares no naturales se describen en la presente y se conocen por aquellos de experiencia en la técnica.

10 Como se usa en la presente, una mezcla isocinética es una en la cual las relaciones molares de aminoácidos se han ajustado basadas en sus velocidades de reacción reportadas (ver, por ejemplo, Ostresh et al., (1994) Biopolymers 34:1681).

15 Como se usa en la presente, la modificación está 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 rutina para aquellos de experiencia en la técnica, tal como al usar metodologías de ADN recombinante.

20 Como se usa en la presente, las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos se conocen por aquellos de experiencia en la técnica y se pueden hacer generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Aquellos de experiencia en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácido simple en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). Tales sustituciones se pueden hacer de acuerdo con aquellas establecidos en la TABLA 1A como sigue:

000055

TABLA 1A

Residuo original	Sustitución conservadora ejemplar
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Otras sustituciones también son permisibles y se pueden determinar empíricamente de acuerdo con las sustituciones conservadoras conocidas.

Como se usa en la presente, un constructo de ADN es una molécula de hebra simple o doble, lineal o circular de ADN 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 más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN

000756

57
más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5' hasta 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa en la presente, el término polinucleótido significa un polímero de hebra simple o doble de deoxiribonucleótidos o bases de ribonucleótido leídos desde el extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar desde fuentes naturales, sintetizar *in vitro*, o preparar desde 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 de bases (abreviado "pb"). El término nucleótidos se usa por moléculas de hebra simple 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 que es equivalente al término pares base. Se reconocerá por aquellos de experiencia 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; por lo tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de hebra doble no se puede emparejar. Tales extremos no emparejados, 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/u homología de secuencias de residuos y los residuos contenidos en las mismas. Los métodos para evaluar el grado de

000057

similitud entre proteínas o ácidos nucleicos se conocen por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácido o nucleótido se alinean de una manera que proporciona un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado al cual las secuencias de aminoácido o nucleótido son invariantes. La alineación de secuencias de aminoácido, y en cierta medida secuencias de nucleótido, también pueden tomar en cuenta diferencias conservadoras y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservadoras son aquellas que conservan las propiedades físico-químicas de los residuos implicados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la totalidad de la longitud de las secuencias e incluyendo todos los residuos) o locales (la alineación de una porción de las secuencias que incluye únicamente las regiones o región más similar).

La "identidad" per se, tiene un significado reconocido en la técnica 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). Si bien existe un número de métodos para medir la identidad entre dos

000058

polinucleótido o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por técnicos expertos (Carillo, H. & Lipton, D., *SIAM J Applied Math* 48: 1013 (1988)).

Como se usa en la presente, homólogo (con respecto a ácido nucleico y/o secuencias de aminoácido) significa alrededor de mayor que o igual a 25% secuencia homología, típicamente mayor que o igual a 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% homología de secuencia; el porcentaje preciso se puede especificar si es necesario. Para propósitos de 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 el concurso de orden más amplio se obtiene (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* 45: 1073). Por homología de secuencia, el número de aminoácidos conservados se determina por programas de algoritmos de alineación estándar, y se pueden usar con penalidades de hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas podrían hibridar típicamente en severidad moderada o en alta severidad todas a lo

000059

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 hibridada.

5 Si cualquiera de las dos moléculas tienen 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 de computadora conocidos tal como el programa "FASTA", usando por ejemplo, los parámetros
 10 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 Molec Biol* 275: 403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed.,
 15 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 para Información sobre Biotecnología se puede usar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen, programa
 20 DNASTar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "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 puede 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, como se revisó 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,

000000

61

nucleótidos o aminoácidos), que son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros predeterminados por el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación pesada 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 penalización de 3.0 para cada hueco y una penalización 0.10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos 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% idéntica a" se refiere a identidades por ciento desde 90 hasta 99.99 relativas a el ácido nucleico de referencia o secuencia de aminoácido del polipéptido. La identidad en un nivel de 90% o más es indicativa del hecho de que, asumiendo para propósitos de ejemplificación se comparan una prueba y longitud de polipéptido de referencia de 100 aminoácidos. No más de 10% (esto es, 10 fuera de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere de la del polipéptido de referencia. Se pueden hacer comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones de punto aleatoriamente distribuidas sobre la totalidad de la longitud de un polipéptido o se pueden agrupar en una o más ubicaciones que varían la longitud hasta lo máximo permitido, por ejemplo,

000061

diferencia de aminoácido 10/100 (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como ácido nucleico o sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido. En el nivel de homologías o identidades por encima de alrededor de 85-
5 90%, el resultado debe ser independiente del programa y conjunto de parámetros de hueco; tales niveles altos de identidad se pueden evaluar fácilmente, frecuentemente por alineación manual sin confiar en software.

Como se usa en la presente, una secuencia alineada se
10 refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que se relacionan por 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias
15 que se alinean en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineación derivadas de ARNs, tal como ESTs y otros cADNs, alineados con la 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
20 iniciación de síntesis de ADN dirigido a plantilla bajo afecciones 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 debe apreciar 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 la extensión. Un cebador se puede usar en una variedad de

métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción de cadena de polimerasa (PCR), transcriptasa inversa (RT)-PCR, ARN PCR, LCR, PCR múltiple, PCR de frontera, PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR in situ, PCR mediado por ligadura y otros
5 protocolos de amplificación.

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

Como se usa en la presente, "específicamente hibridiza" se refiere a combinar los pares de bases, al aparear bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo,
15 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 hibridización específica, tal como longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para
20 hibridización *in vitro* además incluyen temperatura para combinación de pares de bases y 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 alta severidad 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 ajustar fácilmente estos parámetros para alcanzar la hibridización específica de una

000063

molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico
objetivo apropiada para una aplicación particular. De forma
complementaria, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótido,
significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de
5 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 hibridizará bajo condiciones
de alta severidad.

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

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

20 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

000364

65

forma de referencia del gen codifica una forma tipo natural y/o forma predominante de un polipéptido desde una población o miembro de referencia simple de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre dos y entre 5 varias especies típicamente tienen al menos 80%, 90% o mayor identidad de aminoácido con forma tipo natural y/o predominante desde la misma especie; el grado de identidad depende sobre el gen y si la comparación es entre especie o dentro de una especie. Generalmente, variantes alélicas dentro de una especie tienen al 10 menos alrededor de 80%, 85%, 90% o 95% de identidad o mayor con forma tipo natural y/o predominante, incluyendo 96%, 97%, 98%, 99% o mayor de identidad con forma tipo natural y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente generalmente se refiere a proteínas de n variaciones 15 entre miembros de la misma especie.

Como se usa en la presente, "alelo," que se usa intercambiabilmente 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 20 homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, el sujeto se dice que es homocigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos diferentes alelos de un gen, el sujeto se dice que es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir unos de otros en un nucleótido simple o diversos nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, variantes de especies se

000065

refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamífero, tal como ratón y humano.

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

Como se usa en la presente, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que
10 proporcionan para el enlace de polimerasa de ARN e iniciación de transcripción. Las secuencias de promotor son comúnmente, pero no siempre, encontradas en la región de no codificación 5' de genes.

Como se usa en la presente, polipéptido aislado o purificado o proteína o porción biológicamente activa de los mismos es
15 sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes desde la célula o tejido desde la cual la proteína se deriva, o sustancialmente libre desde precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Las preparaciones se pueden determinar para ser sustancialmente
20 libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos estándares de análisis, tal como cromatografía de capa delgada (TLC), electroforesis de gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usado por aquellos de experiencia en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puro de tal manera que además la purificación no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tal como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para purificación de los compuestos para producir

000066

compuestos sustancialmente 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 casos, la purificación
5 adicional podría incrementar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa desde los componentes celulares de las células desde se encuentra
10 aislado o se produce recombinantemente. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de enzima que tienen menos de alrededor de 30% (por peso seco) de proteínas sin enzima (también referidas en la presente como una proteína contaminante),
15 generalmente menos de alrededor de 20% de proteínas sin enzima o 10% de proteínas sin enzima o menos de alrededor de 5% de proteínas sin enzima. Cuando la proteína de enzima se produce recombinantemente, también es sustancialmente libre de medio de cultivo, esto es, el medio de cultivo representa menos de
20 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 productos químicos incluye preparaciones de proteínas de enzima en las cuales la proteína se separa desde precursores químicos u otros productos químicos que se implican en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de enzima que tiene menos de alrededor de 30% (por peso seco) 20%, 10%, 5% o menos de precursores

000067

químicos o productos 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
5 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 al usar métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para
10 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 por ya sea expresión o replicación de los mismos. Los vectores típicamente permanecen episomal, pero se
15 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
20 aquellos de experiencia en la técnica.

Como se usa en la presente, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que se ligan operativamente con secuencias reguladoras, tal como regiones de promotor, que son capaces de efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias de promotor y de terminación, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los

000068

vectores de expresión se derivan generalmente de plásmido o ADN viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a un constructo de ARN o ADN recombinante, 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 permanecen 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 transportes) los genes exógenos en células.

Como se usa en la presente, operativa u operativamente ligado cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos se arreglan para que funcionen en concierto para sus propósitos previstos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación al terminador.

Como se usa en la presente el término evaluar se pretende para incluir determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteína, tal como una enzima o proteasa, o un dominio de los mismos, presente en la muestra, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del

000089

nivel de la actividad. La valoración puede ser directa o indirecta y las especies químicas actualmente detectadas no necesitan por supuesto el producto final de una reacción, tal como un producto de proteólisis de sí mismo, pero por ejemplo
5 puede ser un derivado de los mismos o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la valoración puede ser detección de un producto de escisión de una proteína, tal como por SDS-PAGE y tinción de proteína con azul de Coomassie.

Como se usa en la presente, actividad biológica se refiere a
10 las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan sobre administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas
15 se pueden observar en sistemas *in vitro* diseñados para probar o usar tales actividades. Por lo tanto, para propósitos de la presente de 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
20 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 referirse 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 estar presente en la misma

000070

medida (por ejemplo, dos péptidos pueden exhibir diferentes velocidades del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades usualmente son 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, tal como traducción de señal. La modulación puede incluir un incremento en la actividad (esto es, sobre-regulación o actividad agonista) una disminución en actividad (esto es, sub-regulación o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio en periodicidad, frecuencia, duración, cinéticos u otros parámetros). La modulación puede ser dependiente del contexto y típicamente la modulación se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo natural, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína como se expresa en un tipo de célula designado o condición.

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

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

relacionan.

Como se usa en la presente, un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye otros elementos, tal como reactivos adicionales e instrucciones para el uso de la
5 combinación o elementos de los mismos.

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

Como se usa en la presente, "tratar" un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se
15 alivian parcialmente o totalmente, o permanecen estáticas después del tratamiento. Por lo tanto el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención de empeoramiento de síntomas o progresión de una enfermedad. El tratamiento también
20 abarca cualquier uso farmacéutico de una preparación de inmunoglobulina y composiciones proporcionadas en la presente.

Como se usa en la presente, un agente farmacéuticamente efectivo, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes de dispersión, fármacos terapéuticos convencionales, incluyendo pequeños fármacos de molécula y proteínas terapéuticas.

Como se usa en la presente, tratamiento significa cualquier
000072

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

Como se usa en la presente, mejoría de los síntomas de una enfermedad particular o trastorno por un tratamiento, tal como por la administración de una composición farmacéutica u otro terapéutico, se refiere a cualquier disminución, si es permanente o temporal, perdurable o transitoria, de los síntomas que se pueden atribuir a o asociar con la administración de la composición o terapéutico.

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 lo tanto, es la cantidad necesaria para prevenir, curar, aliviar, detener o parcialmente detener un síntoma de una enfermedad o trastorno.

5 Como se usa en la presente, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales e individualmente envasadas como es conocido en la técnica.

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

10 Como se usa en la presente, un "artículo de fabricación" es un producto que se hace y vende. Como se usa en toda esta solicitud, el término se pretende que abarque IG y composiciones de hialuronidasa contenidas en artículos de envase.

15 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.

20 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, activación, administración, diagnóstico, y valoración de una actividad biológica o propiedad. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones para el uso.

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

Como se usa en la presente, animal incluye cualquier animal,

000074

tal como, pero no se limitan a primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, tal como ratones y ratas; aves, tal como pollos; rumiantes, tal como cabras, vacas, venado, oveja; ovinos, tal como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen humanos como el animal contemplado. Las enzimas se proporcionan en la presente desde cualquier fuente, animal, planta, procariótico 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 desde un voluntario normal no afectado con la afección 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 dicte de otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, referencia a un compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa en la presente, intervalos y cantidades se pueden expresar como "alrededor de" un valor particular o intervalo. Alrededor de también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto "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 posteriormente descrito o circunstancia se hace o no se produce, y que la descripción incluye instancias

donde tal evento o circunstancia ocurre y las instancias donde no lo hace. Por ejemplo, un grupo opcionalmente substituido significa que el grupo es no substituido o es substituido.

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 el IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (ver, (1972) Biochem. 11: 1726).

B. CO-FORMULACIONES ESTABLES DE INMUNOGLOBULINA (IG) E HIALURONIDASA

Se proporcionan en la presente co-formulaciones estables que contienen inmunoglobulina (IG) e hialuronidasa. Las co-formulaciones conservan distribución de tamaño molecular IG y actividad de hialuronidasa después de almacenamiento extendido en forma líquida a temperatura ambiente (por ejemplo, 28 hasta 32°C) durante al menos seis meses. Generalmente, las co-formulaciones también conservan distribución de tamaño molecular IG y actividad de hialuronidasa en temperaturas de refrigeración estándar durante al menos 1-2 años. Las co-formulaciones se pueden usar para tratar enfermedades y afecciones tratables con IG. En particular, las co-formulaciones estables se proporcionan en la presente formuladas para la administración subcutánea.

1. Terapia de Inmunoglobulina

La inmunoglobulina es un terapéutico que se determina principalmente para tratar individuos con inmunodeficiencias. Los Trastornos de deficiencia de inmunoglobulina son un subconjunto de enfermedades de inmunodeficiencia caracterizadas por falta o

000076

77

niveles reducidos de inmunoglobulinas de suero, que lleva a susceptibilidad creciente a infecciones bacterianas, especialmente del tracto sinopulmonar. Las enfermedades de inmunodeficiencia son ya sea primarias (genéticas) o secundarias (adquiridas). Las enfermedades de inmunodeficiencia primaria son raras e incluyen agammaglobulinemia ligada a X, eliminación de cadena pesada de inmunoglobulina, la deficiencia de subclase de inmunoglobulina selectiva G (IgG), inmunodeficiencia variable común, o Síndrome M de hiperinmunoglobulina ligada a X. Los niveles de inmunoglobulina disminuidos también se encuentran en individuos que tienen inmunodeficiencias combinadas debido a defectos en células T y B, tal como, pero no se limita a, inmunodeficiencia combinada severa o Síndrome de Wiskott Aldrich (IUIS Scientific Committee, 1999). Son más comunes las inmunodeficiencias secundarias, inducidas por factores incluyendo, pero no se limita a, desnutrición, virus, envejecimiento y leucemia. Los individuos con estas enfermedades requieren terapia de reemplazo con productos de inmunoglobulina para prevenir o reducir la severidad de infecciones.

La terapia de reemplazo de inmunoglobulina se usó primero en 1952 y se administró intramuscularmente y subcutáneamente. Sin embargo, para tratar eficazmente la enfermedad, grandes cantidades de IG son necesarias, lo que lleva al desarrollo de productos intravenosamente administrables con concentraciones IG inferiores (50-100 mg/mL). Desde 1981, la mayoría de productos de inmunoglobulina disponibles en los Estados Unidos se administran intravenosamente. Generalmente, las preparaciones IG son estériles, productos purificados que contienen inmunoglobulina G

000777

(IgG, IgM, IgA o una combinación de esos). Típicamente, los productos IG contienen IgG 95-99% y únicamente cantidades de huella de inmunoglobulinas A (IgA), M (IgM), D (IgD) y E (IgE). Las preparaciones IG para administración IV se formulan generalmente en IG 3 hasta 12%.

Más recientemente, las preparaciones de inmunoglobulina se han desarrollado para administración subcutánea (Gardulf et al. (2006) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6: 434-42; Gardulf et al. (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 177-85; Ochs et al. (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 265-73), y al menos un producto, Vivaglobin®, se autoriza para administración subcutánea en los Estados Unidos. Una ruta subcutánea de administración de IG tiene diversas ventajas comparada con la ruta IV tal como mejor tolerabilidad y la posibilidad de tratamiento de cuidados en casa.

La biodisponibilidad de inmunoglobulina subcutáneamente administrada generalmente es menos de que infundió intravenosamente. La siguiente administración IV, inmunoglobulina está disponible inmediatamente en la sangre, y lentamente equilibra al compartimento extra-vascular sobre 3 hasta 5 días (Schiff et al. (1986) *J. Clin. Immunol.* 6: 256-64). La inmunoglobulina subcutáneamente administrada se absorbe lentamente desde el espacio subcutáneo en la sangre y al mismo tiempo se equilibra con el compartimento extra-vascular; no hay punta de IV alta. La biodisponibilidad no se ha estudiado extensivamente, pero en un ensayo reciente de la preparación ZLB-Behring (esto es, Vivaglobin®), esto se determinó al medir el área bajo la curva (AUC) que únicamente 67% de la inmunoglobulina se absorbió, y por lo tanto, la dosis recomendada fue 137% de la

79

dosis IV (Ochs et al. (2006) *J. Clin. Immunol.* 26: 265-73). A pesar de las dificultades técnicas de comparar el AUC por dos diferentes rutas y frecuencia de administración, los estudios de inmunoglobulina administrada intradérmicamente en conejos sugiere que se disminuye la biodisponibilidad a través de la ruta subcutánea. Esto puede ser debido al modo de absorción de moléculas de proteína grandes, que no puede difundirse fácilmente a través de las paredes capilares y se debe absorber por medio de los linfáticos (Supersaxo et al. (1990) *Pharm. Res.* 7: 167-9).

Todas de las preparaciones de inmunoglobulina actualmente usadas para administración subcutánea se formulan en IG al 16%, comparado con preparaciones IVIG formuladas en IG al 5 hasta 12%. La mayor concentración de IG en preparaciones subcutáneas relativas a preparaciones IV permite volúmenes de infusión menores; tales preparaciones no se pueden infundir intravenosamente. Tales métodos subcutáneos de terapia de reemplazo de inmunoglobulina se consideran que son efectivos, seguros y también altamente apreciados por pacientes, ya que tiene un bajo riesgo de reacciones adversas sistémicas y lleva a mayores concentraciones de IG de suero base comparado con infusiones de IV mensualmente (Gardulf et al. (1995) *J. Adv. Nurs.*, 21: 917-27; Gardulf et al. (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 92: 200-4; Gardulf et al. (1991) *Lancet*, 338: 162-6).

Además de la biodisponibilidad disminuida asociada con la administración subcutánea de IG, otra distinción entre la administración SC y IV es que únicamente volúmenes pequeños pueden ser infundidos subcutáneamente en cada sitio, que requiere el uso de múltiples sitios en una base semanalmente.

000079

bisemanalmente (una vez la otra semana). En general, sin embargo, los adultos nicamente pueden ser infundidos con 20-40 mL en un sitio subcutáneo simple, con volúmenes inferiores por sitio para niños. Actualmente, la práctica aceptada por administración IG es 300-600 mg/kg intravenosamente una vez cada 3-4 semanas o 100-200 mg/kg/semana subcutáneamente (Berger (2008) *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 28(2): 413-438). Por lo tanto, hasta 15 g de IG se administra por semana subcutáneamente. Esto significa que se requiere la administración de una preparación de IG al 16-20% al menos 3 sitios por semana. Aún cuando la administración semanalmente o bisemanalmente tiene la ventaja agregada de mantener mejores niveles base que infusiones IV mensualmente, el requisito de múltiples inserciones de aguja ha sido un impedimento para muchos pacientes.

Sin embargo, los métodos subcutáneos de terapia de reemplazo de inmunoglobulina se convierten en una alternativa cada vez más popular a terapia IVIG. Los pacientes que tienen reacciones severas a infusiones IVIG pueden frecuentemente tolerar subcutáneamente IG administrado. La administración subcutánea se considera que es efectiva, segura y también altamente apreciada por pacientes, ya que tiene un bajo riesgo de reacciones adversas sistémicas y se puede administrar en casa o en el hospital (Gardulf et al. (1995) *J. Adv. Nurs.* 21: 917-27; Gardulf et al. (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 92: 200-4; Gardulf et al. (1991) *Lancet* 338: 162-6).

2. Administración Subcutánea de Formulaciones de Inmunoglobulina e Hialuronidasa

La biodisponibilidad de IG subcutáneamente administrada se

000080

31

incrementa en combinación con la administración de hialuronidasa, permitiendo de tal modo la administración subcutánea de inmunoglobulina en las dosificaciones y frecuencias similares a tratamiento IVIG (ver por ejemplo, Solicitud de Patente de E.U.A. No. 2010-0074885 y PCT Internacional No. WO 2009-117085, cada una incorporada como referencia en la presente). El espacio subcutáneo (SC), formado por una red de colágeno rellena con ácido hialurónico, una sustancia tipo gel, es en gran parte responsable para la resistencia al flujo de fluido a través de los tejidos. La hialuronidasa es una familia de enzimas que se presentan naturalmente que rompen el ácido hialurónico, que es una sustancia tipo "gel" que llena el espacio encontrada en la matriz extracelular y en tejidos a lo largo del cuerpo tal como la piel y ojo. La hialuronidasa actúa al dividir el enlace glucosaminídico en ácido hialurónico entre el C₁ de una porción de N-acetilglucosamina y C₄ de una porción glucurónica. Esto disminuye temporalmente la viscosidad del cemento celular y promueve la difusión de fluidos inyectados, por lo tanto facilita su absorción. Más tarde, el ácido hialurónico se regenera naturalmente dentro de 24 horas. En consecuencia, se mejoran la biodisponibilidad, las características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de las co-formulaciones que contienen hialuronidasa. Basados en experimentos en animales, la dispersión de fluido incrementado permite la administración de hasta 1 L por hora por medio de la ruta subcutánea, que es una velocidad de flujo tipo IV.

En la presencia de hialuronidasa, la biodisponibilidad de IG subcutáneamente administrado se incrementa, típicamente más que

000981

90% de la biodisponibilidad de IG después del tratamiento IVIG. Además, la co-administración con una hialuronidasa soluble permite la infusión de grandes volúmenes en un sitio subcutáneo simple. Por ejemplo, volúmenes hasta 600 mL o mayor de IG se pueden administrar en un solo sitio en un sola sesión, por ejemplo 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL o más se puede administrar en un solo sitio en una administración simple. Por ejemplo, una preparación de IG formulada en o entre 5-12%, por ejemplo en proteína al 10%, que típicamente se usa únicamente para terapia IVIG se puede co-administrar subcutáneamente con una hialuronidasa soluble en dosificaciones equivalentes a dosis de IVIG una vez al mes, por ejemplo, en o alrededor de 100 mg/kg, 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg o más. Las preparaciones IG en concentraciones mayores de proteína, por ejemplo, IG al 12-25% tal como 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22% o más también se pueden administrar subcutáneamente en la presencia de hialuronidasa. Las dosificaciones se pueden administrar como una dosis simple o se pueden dividir en dosis múltiples administradas diariamente o semanalmente, tal como una vez por semana o cada dos, tres o cuatro semanas o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, IG, cuando se administra subcutáneamente en la presencia de hialuronidasa, se puede administrar una vez mensualmente en dosis IVIG prevalecientes por la indicación particular. Además, ya que la hialuronidasa actúa para abrir los canales de flujo en la piel, que puede acelerar las velocidades de infusión. Por lo tanto, administrar subcutáneamente IG administrado con hialuronidasa incrementa las velocidades de infusión y por lo tanto disminuye el tiempo de

suministro de la terapia de IG.

Al administrar IG subcutáneamente en la presencia de una hialuronidasa, una o todas de las consideraciones y problemas asociados con administración subcutánea de IG se dirigen. Por lo tanto, en virtud de las propiedades de dispersión de la hialuronidasa, administrar subcutáneamente IG en la presencia de una hialuronidasa soluble permite la administración de dosis de IVIG en frecuencias de IVIG una vez al mes, mientras que se mantiene la biodisponibilidad de IVIG.

3. Co-formulaciones Estables

Ya que las preparaciones de inmunoglobulina subcutáneamente administrables tienen la ventaja de tratamiento de cuidado en casa, se contempla una preparación lista para su uso, estable de IG y hialuronidasa. Las proteínas usadas para terapia se someten típicamente a un intervalo de afecciones durante el procesamiento y almacenamiento, incluyendo pH bajo, las fluctuaciones en temperatura, diversos componentes de solución amortiguadora y fuerzas iónicas, y, frecuentemente, alta concentración de proteína en la preparación final. Para ser eficaz, sin embargo, la co-formulación debería conservar suficiente actividad del IG y hialuronidasa. Por lo tanto, una co-formulación de IG y hialuronidasa se debe proporcionar como una solución estable para almacenamiento como una solución acuosa sin deteriorar por periodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, se proporciona en la presente una co-formulación líquida estable de IG y hialuronidasa. La co-formulación es tal que se proporciona como una forma de dosificación que se puede usar para inyección directa, esto es, no diluida antes de usar.

000083

Se encontró en la presente que un producto co-formulado preparado por la adición de una hialuronidasa designada rHuPH20 a una preparación de IG antes de la administración no fue estable a temperatura ambiente. La adición de sal mejora la estabilidad de la formulación, en particular, la mantener la actividad de la hialuronidasa en la formulación. Por lo tanto, además de que contienen una cantidad efectiva de IG y hialuronidasa, las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente también contienen al menos 50 mM de una sal de cloruro de metal alcalino, por ejemplo, NaCl o KCl. Típicamente, las co-formulaciones estables también contienen un aminoácido, por ejemplo glicina, como un estabilizador y se proporcionan en un pH de alrededor de 4 hasta 5. En general, la relación de hialuronidasa a IG en un producto co-formulado es mayor que la relación cuando los mismos productos (IG y hialuronidasa) y la misma cantidad de IG se administran subcutáneamente por separado, por ejemplo, en una administración de borde sobresaliente.

Generalmente, la co-formulación estable es una formulación líquida. El almacenamiento de la co-formulación directamente en una forma líquida toma ventaja de la conveniencia de que tiene estabilidad de almacenamiento en la forma líquida, fácil de administración sin la reconstitución, y capacidad para suministrar la formulación en prellenado, jeringas listas para usar o como preparaciones multidosis. Por lo tanto las co-formulaciones líquidas proporcionan una preparación de IG lista para usar y hialuronidasa para administración subcutánea a un sujeto sin que tenga que reconstituir la preparación exactamente y asépticamente y que espera por un periodo de tiempo hasta que

000084

la solución clarifica antes de administrar la formulación al sujeto. Se simplifica el procedimiento de administrar la formulación a un sujeto por un profesional de la salud. Además, el proceso de fabricación de las formulaciones líquidas se simplifica y más eficiente que el proceso de fabricación para la versión liofilizada ya que todas las etapas de la fabricación de las formulaciones líquidas se llevan a cabo en una solución acuosa, que no implica proceso de secado, tal como liofilización y secado por congelado. En consecuencia, es más rentable también.

La co-formulación estable se puede proporcionar como una solución líquida en un recipiente o jeringa. Tal co-formulación se puede dispensar convenientemente a humanos u otras especies de mamíferos como un fármaco sin re-constitución adicional por el médico o paciente.

Además, debido a su alta estabilidad durante el almacenamiento, las co-formulaciones pueden contener alta concentración de proteínas en el intervalo de alrededor de 10% hasta 22% de IG, tal como 10% hasta 20% de IG sin causar un efecto adverso en las actividades biológicas de IG debido a la agregación de proteína y/o fragmentación durante un almacenamiento prolongado. Tal estabilidad no únicamente asegura la eficacia de la co-formulación de IG, pero también reduce los posibles riesgos de causando efectos adversos en un sujeto. Por lo tanto, las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente conservan actividad enzimática de hialuronidasa y actividad de IG minimizando la auto-asociación y agregación de IG. Generalmente, la actividad se mantiene en una temperatura que es hasta 32°C, por ejemplo en o alrededor de 0°C hasta 32°C,

000085

generalmente en o alrededor de 28°C hasta 32°C. La estabilidad de la co-formulación se mantiene sobre periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o más. Las co-formulaciones tienen la ventaja de que son estables en forma líquida durante el almacenamiento por periodos prolongados de tiempo de al menos 6 meses. En un ejemplo, las co-formulaciones estables son estables en líquido durante al menos 1 año o más, por ejemplo, 1 año hasta 2 años, tal como 1 año, 2 años, o más en temperaturas de refrigeración estándar (aproximadamente $4 \pm 2^\circ\text{C}$, o alrededor de $2-8^\circ\text{C}$, o, más generalmente, que van desde alrededor de $0-10^\circ\text{C}$). En otro ejemplo, las co-formulaciones son estables en forma líquida durante el almacenamiento a temperatura ambiente (en el intervalo de $18-32^\circ\text{C}$, por ejemplo, 28°C hasta 32°C) durante al menos seis meses. Por ejemplo, las co-formulaciones estables generalmente tienen una vida útil de al menos o alrededor de 6 meses hasta 18 meses, por ejemplo 6 meses, 12 meses, 18 meses, o más cuando se almacena a temperatura ambiente.

Las siguientes secciones describen las formulaciones proporcionadas en la presente, incluyendo inmunoglobulinas ejemplares y hialuronidasas en las formulaciones, métodos para fabricarlos, y métodos para usar las co-formulaciones estables para tratar enfermedades y afecciones tratables con IG.

C. INMUNOGLOBULINA Y PREPARACION DE GLOBULINA INMUNITARIA

Se proporcionan en la presente inmunoglobulinas (IG, también referidas como inmunoglobulina, globulina gamma o IgG) que se pueden formular en composiciones estables con hialuronidasa. Las

000386

co-formulaciones estables se pueden usar para el uso en tratar enfermedades y afecciones tratables con IG.

Las inmunoglobulinas son proteínas de globulina gamma producidas por el sistema inmune humoral y encontradas en el plasma de animales superiores. La IG actúa para reforzar el sistema inmune al modular la actividad de complementar, suprimir la auto producción de anticuerpo, saturar o bloquear los receptores Fc en macrófagos y linfocitos B, y suprimir la producción de mediadores inflamatorios tal como citocinas, quimiocinas y metaloproteinasas. La IG se compone de cinco clases, o isotipos, de anticuerpos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) y diversas subclases, cada una con especificidades diversas. La IgG es la clase más predominante de IG encontrada en la sangre y es importante en las respuestas inmunitarias secundarias y tejidos de protección contra la infección. La Tabla 2 ilustra cantidades típicas de inmunoglobulinas encontradas en el suero, aunque las preparaciones de IG para el tratamiento pueden emplear las etapas de purificación para alterar las relaciones de una clase o clases de inmunoglobulina particulares. Por ejemplo, cromatografía de sefarosa de proteína A, proteína G o de proteína H se puede usar para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas por IgG, o por subtipos de IgG específicos (ver, por ejemplo, Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Patente de E.U.A. No. 5,180,810).

000387

Tabla 2. Inmunoglobulina de Suero

Clase Ig	Nivel de Suero mg/mL (%)	Función
IgG	1200 (77)	Clase IG mayor en humanos; respuesta inmunitaria secundaria; protege contra infección
IgA	200 (13)	Protege la mucosa
IgM	150 (9)	IG mayor para respuestas inmunitarias primarias
IgD	2 (<1)	Regula células B
IgE	<1 (huella)	IG mayor en respuesta alérgica

1. Preparación y Purificación

Las preparaciones de inmunoglobulina proporcionadas en la presente se pueden preparar desde cualquiera de los materiales de partida adecuados. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden aislar desde sangre humana o animal, por ejemplo, de suero de donante humano, o producido por otros medios, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante o tecnología de hibridoma. Por lo tanto, las preparaciones de inmunoglobulina pueden incluir inmunoglobulinas monoclonales o recombinantes. Por ejemplo, la inmunoglobulina se puede obtener desde tejidos, cultivos de hibridoma de linfocito, plasma sanguíneo o suero, o cultivos celulares recombinantes usando cualquier procedimiento adecuado, tal como, por ejemplo, precipitación (fraccionamiento de alcohol de Cohn o fraccionamiento de polietilenglicol); métodos cromatográficos (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inunoafinidad); ultracentrifugación; o preparación electroforética (ver, por ejemplo, Cohn et al. (1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-75; Oncley

000088

et al. (1949) *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 541-50; Barandern et al. (1962) *Vox Sang.*, 7: 157-74; Koblet et al. (1967) *Vox Sang.*, 13: 93-102; Patente de E.U.A. Nos. 5,122,373 y 5,177,194).

Típicamente, la inmunoglobulina se prepara desde productos que contienen globulina gamma producidos por fraccionamiento de alcohol y/o intercambio de iones y métodos de cromatografía de afinidad bien conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

Las etapas preparativas se pueden usar para enriquecer un isotipo particular o subtipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, cromatografía de sefarosa de proteína A, proteína G o proteína H se puede usar para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas por IgG, o por subtipos de IgG específicos. (Ver generalmente Harlow and Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Patente de E.U.A. No. 5,180,810).

a. Método Cohn-Oncley

Los métodos industriales convencionales de purificación de inmunoglobulina de plasma sanguíneo se basan en fraccionamiento de etanol frío, que co-precipitan grupos de proteínas basados en sus puntos isoeléctricos en concentraciones de alcohol determinadas en temperaturas bajo cero, originalmente empleadas por Cohn y modificadas por Oncley (ver, por ejemplo, Cohn et al. (1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-75; Oncley et al. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* 71: 541-50). El uso de alcohol en el proceso de purificación puede inactivar potencialmente la contaminación de

000089

virus, sin embargo, con aumento de la temperatura y concentración de alcohol, el método Cohn-Oncley puede resultar en proteínas desnaturalizadas y agregadas. Estas formas de alto peso molecular pueden actuar como complejos de anticuerpo-antígeno que tienen la capacidad para fijar el complemento libremente.

b. Procedimientos Cohn-Oncley Modificados

Para prevenir los efectos no deseados del método Cohn-Oncley, los métodos Cohn-Oncley modificados se han desarrollado para la preparación y purificación de IG. Diversos de tales procedimientos se conocen y se pueden adaptar y modificar para producir las preparaciones IG en la presente. Esto está dentro de la experiencia de la técnica para preparar preparaciones IG en vista de los métodos detallados conocidos y disponibles en la técnica.

Típicamente, la IG se fabrica usando un fraccionamiento de etanol frío primario y un fraccionamiento secundario que puede incluir, por ejemplo, cualquier de una o más de las siguientes etapas para obtener un producto que tiene una baja actividad anti-complementaria (ACA): La separación de agregados IG por técnicas convencionales, tal como ultra-centrifugación o cromatografía de exclusión; modificación química de las moléculas de IG por alcoholización, alquilación, sulfonación y tratamiento con agentes de reducción (ver por ejemplo, Patente de E.U.A. 6,875,848); incubación en un pH moderadamente ácido (pH 4.0) con o sin pepsina, plasmina y tripsina inmovilizada; fraccionamiento de plasma humano por medios de polímeros de etilenglicol (Poison et al. (1964) *Biochim. Biophys. Acta.* 82: 463-475), incorporación

000799

de polietilenglicol (PEG) como un agente de purificación por material separado desde el fraccionamiento Cohn (fracción II o II + III, ver por ejemplo, Patente de E.U.A. Nos. 4,093,606 y 4,165,370), métodos de fraccionamiento que usan polietilenglicol como un agente de precipitación, y otras técnicas descritas en la Patente de E.U.A. Nos. 4,093,606, 4,126,605, 3,966,906, y 4,124,576, y otros métodos similares de procesos de purificación con polietilenglicol (EP 0246579); tratamiento de B-propiolactona; cromatografía de intercambio iónico para eliminar contaminantes indeseables desde los materiales de partida usados para obtener las preparaciones IG (ver por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 3,869,436, EP 91300790 y WO 94/29334). La EP 0440483 describe una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa del producto basado en cromatografía de intercambio iónico y diafiltración en un pH débilmente ácido; escisión enzimática; tratamiento de solvente/detergente; y diafiltración y ultrafiltración. Otros métodos también se describen en la técnica y son conocidos por uno de experiencia en la técnica (ver por ejemplo, Patentes de E.U.A. 5,177,194 y 6,875,848).

La Fracción II de Cohn purificada se usa comúnmente. La pasta de Fracción II de Cohn de partida es típicamente alrededor de 95 por ciento IgG y también contiene los cuatro subtipos IG. Los diferentes subtipos se presentan en la Fracción II en aproximadamente la misma relación como se encuentran en el plasma humano agrupado del cual se obtienen. La Fracción II se purifica además antes de la formulación en un producto administrable. Por ejemplo, la Fracción II se puede disolver en solución de alcohol

000391

acuosa purificada fría e impurezas removidas por medio de la precipitación y filtración. Después de la filtración final, la suspensión de inmunoglobulina se puede dializar o diafiltrar (por ejemplo, usando membranas de ultrafiltración que tienen un peso molecular nominal limite de menos de o igual a 100,000 daltons) para remover alcohol. La solución se puede concentrar o diluir para obtener la concentración de proteína deseada y se puede además purificar por técnicas bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

c. Procesamiento Viral

Las preparaciones de IG se deben tratar para remover carga viral. Hay dos métodos de procesamiento viral: la inactivación viral y distribución viral o eliminación. La inactivación viral hace virus inactivos al, por ejemplo, químicamente alterar el lípido o capa de proteína, o por la desnaturalización completa del virus. Ejemplar de métodos de inactivación viral incluyen, pero no se limitan a, calentar (pasteurización), tratamiento solvente/detergente (S/D) y exposición a un ambiente ácido (bajo pH). El proceso S/D es el método de inactivación viral más ampliamente usado en la industria de plasma sanguíneo, usado para inactivar virus que contiene una capa de lípido. Por ejemplo, el proceso S/D se ha demostrado que tiene acción virucida contra VSV (virus de estomatitits vesicular), virus Sindbis, VIH, HBV (virus hepatitis B) y HCV (virus de hepatitis C).

La eliminación viral es un método que elimina completamente todos los virus desde la muestra. Ejemplar de la distribución viral o eliminación incluye, pero no se limitan a

000092

fraccionamiento de etanol frío, distribución de fase o precipitación PEG, cromatografía de afinidad, intercambio de ión o cromatografía de exclusión de gel y nanofiltración.

5 **d. Concentración de Proteína**

Las inmunoglobulinas se pueden preparar en diferentes concentraciones. Por ejemplo, las IG se puede preparar en concentraciones de proteína que van desde en o alrededor de 3-25% de IG, típicamente en o alrededor de 10% hasta 22%, tal como 10%
10 - 20% en p/v. Por ejemplo, preparaciones IG pueden ser en o alrededor de 18% hasta 22% de IG p/v. Las preparaciones IG proporcionadas en la presente generalmente se preparan en concentraciones IG de en o alrededor de 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22% o más. La concentración de
15 proteína final depende en gran medida en el método de generación y purificación. Se contempla en la presente que cualquier preparación de inmunoglobulina se puede usar en la presente para co-formulaciones estables con hialuronidasa. Esto está dentro del nivel de uno de experiencia en la técnica para determinar
20 empíricamente la concentración apropiada de IG para su inclusión en las co-formulaciones estables en la presente. La elección de preparación de IG dependerá de una variedad de factores tal como la vía de administración, el paciente a tratarse y el tipo de afección a tratarse.

Por ejemplo, cualquier preparación de IG conocida o existente se puede usar. Estas incluyen preparaciones de IG típicamente usadas para administración IV (IVIG). En general, preparaciones de IG finales por administración intravenosa tienen

una concentración de proteína de alrededor de 3 hasta 12% en p/v, o típicamente 10% en p/v. Por ejemplo, IVIG está comercialmente disponible como Carimune® NF, Flebogamma® 5%, Gammagard® Líquido, Gammagard® S/D, Gamunex®, Iveegam® EN, Octagam® y Polygam® S/D.

5 Típicamente, tales preparaciones usan un método de fraccionamiento de alcohol frío, pero difiere en los métodos usados para aislar y purificar la inmunoglobulina y métodos para reducir contaminación de virus potencial.

Además, otras preparaciones actualmente formuladas por
10 administración intramuscular o subcutánea se pueden usar en las composiciones y métodos proporcionados en la presente. Por ejemplo, las preparaciones IG por administración intramuscular y administración subcutánea están comercialmente disponibles como GamaSTAN® S/D y Vivaglobin®, respectivamente. Típicamente, tales
15 preparaciones usan fraccionamiento de etanol frío desde plasma humano y tienen una concentración IgG de alrededor de 15 hasta 18% o 10 hasta 22%, respectivamente. La Solicitud Provisional de E.U.A. No. 61/181,606 describe la generación de una composición de inmunoglobulina altamente purificada y concentrada desde el
20 plasma agrupado por administración subcutánea.

e. Preparaciones IG Ejemplares

i. IG al 10%

Ejemplares de una preparación IG es Inmunoglobulina Intravenosa (Humano), 10% (IVIG, 10%, comercializado como Gammagard® líquido, Baxter Healthcare Corporation), que es una preparación IgG no modificada líquida, con una distribución de subclases IgG similares a la de plasma normal. La preparación

000094

95

contiene fragmento intacto cristalizable (Fc) y regiones de enlace de antígeno de fragmento (Fab). Las preparaciones contienen proteína 100 mg/mL, con al menos 98% que es IgG; IgA se presenta en una concentración de 37 µg/mL, e IgM se presenta únicamente en cantidades de huella. Esto tiene una osmolalidad que es similar a la osmolalidad fisiológica, y no contiene azúcares agregados, sodio o conservadores. Esto se formula con glicina por estabilización en un pH de 4.6 hasta 5.1. El proceso de fabricación emplea un procedimiento de fraccionamiento de alcohol frío Cohn-Oncley modificado y purificaciones adicionales por un proceso continuo a través del uso de cromatografía de intercambio de catión débil y cromatografía de intercambio de anión débil. El proceso de fabricación también incluye 3 etapas de inactivación viral independiente o eliminación: tratamiento solvente/detergente (S/D), nanofiltración e incubación en un bajo pH y temperatura elevada. La preparación de una preparación IVIG al 10% se describe en el Ejemplo 1.

ii. Preparaciones de IG de Alta Concentración (por ejemplo, 20% IG)

La generación de preparaciones de inmunoglobulina de alta concentración se describe en la Solicitud Provisional de E.U.A. No. 61/181,606. Ejemplar de las preparaciones que contienen IG al 18-22% se purifican altamente, las formulaciones líquidas isotónicas de inmunoglobulina (al menos 95% de IgG) formuladas en glicina 0.25 mM en pH 4.4 hasta 4.9, representadas en los Ejemplos abajo.

Los productos IgG de alta concentración, descritos en la presente, se producen por un proceso que tiene muchas

000005

5 mismas o similares etapas como en el proceso de producir preparaciones IVIG tradicionales (por ejemplo, IG al 10%). Las etapas adicionales, ultrafiltración/diafiltración usando membranas de canal abierto con un post-lavado específicamente
10 diseñado y la formulación cerca del final del proceso de producción, rindiendo las composiciones IG resultantes alrededor de dos veces tan alto en concentración de proteína (200 mg/mL) comparado con el estado de la técnica IVIGs (por ejemplo, Gammagard Liquid), sin afectar el rendimiento y estabilidad de
15 almacenamiento. Con más membranas de ultrafiltración comercialmente disponibles, una concentración de IgG 200 mg/mL no se puede alcanzar sin grandes pérdidas de proteína. Estas membranas se bloquean tempranamente, por consiguiente el post-lavado adecuado es difícil de alcanzar. Por lo tanto, tienen que
20 usarse configuraciones de membrana de canal abierto. Además, se emplea un procedimiento de post-lavado específicamente diseñado para obtener la concentración IG requerida sin pérdida de proteína significativa (pérdida de menos de 2%); la mayor concentración de proteína de 200 mg/mL no afecta la capacidad de inactivación de virus de la etapa de almacenamiento de bajo pH.

El proceso general para producir la composición IG de alta concentración incluye las siguientes etapas que se describen en detalles adicionales en el Ejemplo 2. En primer lugar, los crioprecipitados se separan desde plasma previamente congelado hasta producir una "plasma crio-pobre," líquida que se procesa en la siguiente etapa para obtener el sobrenadante (o Fraccionamiento I). El ajuste de pH y concentración de etanol, típicamente hasta 7 y 20 hasta 25% v/v, respectivamente, seguido

000096

por centrifugación posterior mientras que disminuye la temperatura, separa el líquido y sólido. El precipitado desde esta etapa se extrae luego, se mezcla con sílice ahumado, y filtra, todas las etapas realizadas a bajas temperaturas, típicamente 2 hasta 8°C. El filtrado se mezcla luego con polisorbato-80 y citrato de sodio deshidratado mientras se agita a 2 hasta 8°C. El precipitado G se obtiene luego, de una manera similar a la etapa de precipitación de Cohn II, en la cual el pH y concentración de alcohol se ajusta. El precipitado G se disuelve y filtra con un filtro de profundidad de un tamaño de poro nominal de 0.2 μm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado claro. El tratamiento de solvente/detergente posterior, típicamente usando 1.0% (v/v) Triton X- 100, Tween-80 0.3% (v/v), y TNBP 0.3% (v/v), en 18 hasta 25°C durante al menos 60 minutos, seguido por cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de intercambio de anión y nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro Asahi Planova 35N o equivalente. Posterior a la nanofiltración, el filtrado se concentra a una concentración de proteína de $5 \pm 1\%$ en p/v por ultrafiltración. En algunos ejemplos, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular nominal (NMWCO) de 50 kDa o menos. Sobre la terminación de la etapa de ultrafiltración, el concentrado se diafiltra contra una solución de glicina 0.25 M con un pH bajo. Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es 6 veces el volumen de concentrado original, y la solución se concentra a una concentración de proteína de más de 20% en p/v. Al final del

000097

proceso de la diafiltración y concentración, el pH de la solución es típicamente entre 4.4 hasta 4.9. Para formulación, la concentración de proteína de la solución se ajusta luego a sólo, sobre 20% en p/v, por ejemplo, $20.4 \pm 04\%$ en p/v, con la solución amortiguadora de diafiltración. La solución formulada a granel se esteriliza además por la primera filtración a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de 0.2 micras o menos. Luego la solución se dispensa asépticamente en recipientes finales para sellado adecuado, con muestras tomadas para pruebas.

La etapa final se almacena en los recipientes sellados en 30 hasta 32°C por un periodo de tiempo extendido, por ejemplo, 21 hasta 22 días.

La incorporación de etapas de ultrafiltración y formulaciones en el proceso de fabricación es una mejora sobre la purificación IG previamente usada y métodos de concentración, que resultan en preparaciones con mayores concentraciones de IG sin pérdida de actividad IG significativa mientras que se mantiene un pH bajo en la formulación final. Típicamente, los productos tienen una concentración de proteína de al menos 18% en peso/volumen (p/v), de la cual la gran mayoría (típicamente no menos de 95%) es IgG, y un pH en el intervalo de pH 3-6, que facilita la inactivación de patógenos tal como virus que se pueden presentar en el plasma. Debido a la alta concentración de IG y por lo tanto reducir el volumen en la administración, las altas preparaciones de concentración son adecuadas para la administración subcutánea. En algunas modalidades, los productos de IG tienen una viscosidad no mayor que 18 mPascal·segundo y puede por lo tanto ser adecuado para la administración

000098

intravenosa también. La dilución simple también puede permitir la administración intravenosa.

2. Estabilidad de Almacenamiento

5 Las formulaciones IG purificadas, finales se deben preparar para conservar la actividad del IG y evitar la agregación excesiva. Sobre el almacenamiento de las preparaciones IG, la agregación se puede minimizar y mejorar la estabilidad por, por ejemplo, la adición de excipientes de estabilización de proteína
10 o ajustar el pH de la solución.

a. Excipientes de estabilización de proteínas

Una forma para incrementar la estabilidad de preparaciones de IG que es bien conocida en la técnica es agregar excipientes de estabilización de proteína a la preparación IG. Los
15 excipientes conocidos incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, aminos, sales, polímeros y tensoactivos. Por ejemplo, Patente de E.U.A. 4,499,073 describe la estabilización como un resultado de fuerza iónica y pH de la solución de almacenamiento; Patente de JP 54020124 describe la
20 adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para hacer la preparación estable y segura para almacenamiento; JP 57031623 y JP 57128635 describen el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones IG 5 hasta 15% para alcanzar estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular; JP 4346934 describe el uso de baja conductividad (menos de 1 mmho), pH 5.3 hasta 5.7 y opcionalmente uno o más estabilizadores, incluyendo PEG, albumina de suero humano y manitol; US 4,439,421 enseña la adición de una macromolécula hidrofílica, un poliol y

000099

otra proteína para estabilizar contra la generación anti-complemento; la US 5,945,098 describe la estabilización de soluciones isotónicas por la adición de aminoácidos (0.1 hasta 0.3 M glicina) y detergentes no iónicos (polisorbato y PEG); US 4,186,192 describe diversos aditivos, incluyendo aminoácidos; WO. 2005/049078 describe la estabilización con maltosa, y adicionalmente, glicina hasta 0.1 M; US 4,362,661 describe el uso de aminoácidos neutrales y básicos para impartir estabilidad en una preparación IG al 5%. Las formulaciones líquidas estables también se pueden preparar usando carbohidratos en un medio acuoso con fuerza iónica muy baja y un pH de 4.25 (Patente de E.U.A. No. 4,396,608) o un pH débilmente ácido de 5-6 (EP 0278422).

También se puede controlar la formación de dímeros de preparaciones de IG. Por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 5,871,736 describe preparaciones IG, preparaciones particularmente líquidas, que contienen uno o más estabilizadores anfifílicos contra formación de dímero. Los estabilizadores anfifílicos incluyen ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida, y principalmente en conjunto con aminoácidos que tienen cadenas laterales lipofílicas descargadas, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina.

b. pH

Las preparaciones IG se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, tal como cualquiera de los descritos en la presente. Generalmente, sin embargo, el pH de la preparación

000100

final se ajusta a un pH relativamente alto, es decir en el intervalo de alrededor de pH 4.0 hasta 7.4. Se ha encontrado que el pH de la preparación de inmunoglobulina es un factor importante relativo al contenido de monómero IgG del producto final. Generalmente, un 5 por ciento de preparación de inmunoglobulina tiene un pH de 4.2 ± 0.5 . Diez por ciento de las preparaciones son más estables en un pH de 5.2 ± 0.2 . El pH óptimo se obtiene por las técnicas de formulación bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, el pH óptimo se puede determinar desde las determinaciones de cromatografía de exclusión por tamaño así como datos de estabilidad de calor y títulos de anticomplemento de las diversas preparaciones bajo diferentes afecciones de pH.

15 D. Hialuronidasa

Se proporcionan en la presente co-formulaciones estables que contienen inmunoglobulina y una hialuronidasa, típicamente una hialuronidasa soluble. Las hialuronidasas son miembros de una gran familia de enzimas que degradan ácido hialurónico, que es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis de ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, hialuronidasa baja la viscosidad de ácido hialurónico, de este modo incrementa la permeabilidad de tejido. Como tal, las hialuronidasas se han usado, por ejemplo, como una agente de extensión o dispersión en conjunto con otros agentes, fármacos y proteínas para aumentar su dispersión y suministro. Ejemplar de hialuronidasas en las co-formulaciones se

000101

proporcionan en la presente hialuronidasas solubles.

Hay tres clases generales de hialuronidasas; hialuronidasa de mamífero, hialuronidasa bacteriana y hialuronidasa de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos.

5 Las hialuronidasas de tipo mamífero (EC 3.2.1.35) son endo-
β-N-acetil-hexosaminidasas que hidrolizan el enlace β1→4
glicosídico de hialuronano en diversas longitudes de
oligosacárido tal como tetrasacáridos y hexasacáridos. Estos
tienen ambas actividades hidrolítica y de transglicosidasa, y
10 pueden degradar hialuronano y sulfatos de condroitina (CS),
generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo
incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (bovino)
(SEQ ID NOS: 10 y 11), ratón (SEQ ID NOS: 17-19, 32), cerdo (SEQ
ID NOS: 20-21), rata (SEQ ID NOS: 22-24, 31), conejo (SEQ ID NO:
15 25), oveja (ovino) (SEQ ID NOS: 26 y 27), orangután (SEQ ID NO:
28), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), conejillos de indias (SEQ
ID NO: 30), y hialuronidasas de humano.

Las hialuronidasas de mamífero se pueden además subdividir
en aquellas que son activas neutras, predominantemente
20 encontradas en extractos de testículos, y activas ácidas,
predominantemente encontradas en órganos tal como el hígado. Las
hialuronidasas activas neutras ejemplares incluyen PH20, que
incluye pero no se limita a, PH20 derivadas de diferentes
especies tal como ovino (SEQ ID NO: 27), bovino (SEQ ID NO: 11) y
humano (SEQ ID NO: 1). La PH20 humano (también conocido como
SPAM1 o proteína PH20 de superficie de esperma), se enlaza
generalmente a la membrana de plasma por medio de una ancla de
glicosilfosfatidil inositol (GPI). Se implica naturalmente en la

000102

adherencia espermato-óvulo y ayuda a la penetración por espermato de la capa de células del cúmulo por la digestión de ácido hialurónico.

Además de la PH20 humana (también denominada SPAM1), cinco genes tipo hialuronidasa se han identificado en el genoma humano, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 y HYALP1. El HYALP1 es un pseudogen, y HYAL3 (SEQ ID NO: 38) no se ha mostrado que posee actividad de enzima hacia cualquiera de los substratos conocidos. El HYAL4 (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 39) es una condroitinasa y exhibe poca actividad hacia hialuronano. El HYAL1 (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 36) es la enzima activa de ácido prototipo y PH20 (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 1) es la enzima activa neutral prototipo. Las hialuronidasas de ácido activo, tal como HYAL1 y HYAL2 (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 37) generalmente carece de actividad catalítica en pH neutral (esto es pH 7). Por ejemplo, HYAL1 tiene poca actividad catalítica *in vitro* sobre pH 4.5 (Frost et al. (1997) *Anal. Biochemistry*, 251: 263-269). HYAL2 es una enzima de ácido activo con una actividad específica muy baja *in vitro*. Las enzimas tipo hialuronidasa también se pueden caracterizar por aquellas que generalmente se enlazan a la membrana de plasma por medio de una ancla glicosilfosfatidil inositol tal como HYAL2 humano y PH20 humano (Danilkevitch-Miagkova et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(8): 4580-5), y aquellos que generalmente son solubles tal como HYAL1 humano (Frost et al, (1997) *Biochem Biophys Res Commun*. 236(1): 10-5).

1. PH20

PH20, como otras hialuronidasas de mamífero, es una endo- β -N-acetil-hexosaminidasa que hidroliza el enlace $\beta 1 \rightarrow 4$ glicosídico de ácido hialurónico en diversas longitudes de oligosacárido tales como tetrasacáridos y hexasacáridos. Tienen ambas actividades hidrolítica y de transglicosidasa y pueden degradar ácido hialurónico y sulfatos de condroitina, tal como C4-S y C6-S. La PH20 se implica naturalmente en adherencia espermato-óvulo y ayuda a la penetración por espermato de la capa de células de cúmulo al digerir ácido hialurónico. La PH20 se ubica en la superficie del espermato, y en el acrosoma derivado de lisosoma, donde se enlaza a la membrana acrosómica interior. La PH20 de membrana de plasma tiene actividad de hialuronidasa únicamente en pH neutral, mientras que la membrana acrosómica interior PH20 tiene actividad en ambos pH neutral y ácido. Además de ser una hialuronidasa, PH20 también parece ser un receptor para señalización inducida por HA, y un receptor para la zona pelúcida que rodea el ovocito.

Las proteínas PH20 ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos PH20 de humano (polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 1, polipéptido maduro establecido en la SEQ ID NO: 2), bovino (SEQ ID NOS: 11), conejo (SEQ ID NO: 25), PH20 ovino (SEQ ID NOS: 27), Mono cynomolgus (SEQ ID NO: 29), conejillos de indias (SEQ ID NO: 30), rata (SEQ ID NO: 31) y ratón (SEQ ID NO: 32).

La PH20 de bovino es un polipéptido precursor de aminoácido 553 (SEQ ID NO: 11). La alineación de PH20 de bovino con la PH20 de humano muestra únicamente homología débil, con múltiples

huecos que existen desde el aminoácido 470 a través de los respectivos extremos carboxi debido a la ausencia de una ancla GPI en el polipéptido de bovino (ver por ejemplo, Frost GI (2007) *Expert Opin. Drug. Deliv.* 4: 427-440). De hecho, claras anclas GPI no se prevén en muchas otras especies de PH20 además de las humanas. Por lo tanto, los polipéptidos PH20 producidos desde ovino y bovino naturalmente existen como formas solubles. Aunque la PH20 de bovino existe muy vagamente enlazada a la membrana plasma, no está anclada por medio de un ancla sensible de fosfolipasa (Lalancette et al. (2001) *Biol Reprod.* 65(2): 628-36). Esta característica única de hialuronidasa de bovino ha permitido el uso de la enzima de hialuronidasa de testículos de bovino soluble como un extracto para uso clínico (Wydase®, Hyalase®).

El transcrito de mRNA de PH20 humana se traduce normalmente para generar un polipéptido precursor de aminoácido 509 (SEQ ID NO: 1) que contiene una secuencia de señal del aminoácido 35 en la terminal N (posiciones de residuo de aminoácido 1-35) y una secuencia de señal enlazada a ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de aminoácido 19 en la terminal C (posiciones de residuo de aminoácido 491-509). La PH20 madura es, por lo tanto, un polipéptido de aminoácido 474 establecido en la SEQ ID NO: 2. Después del transporte del polipéptido precursor al ER y eliminación del péptido de señal, el péptido de señal enlazado a GPI de terminal C se desdobla para facilitar enlace covalente de una 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: 1. Por lo

000105

tanto, un polipéptido maduro anclado a GPI de aminoácido 474 con una secuencia de aminoácido establecido en la SEQ ID NO: 2 se produce.

Comparada con otras hialuronidasas, incluyendo PH20 de hialuronidasa de miel y veneno de abeja y ratón, mono y conejillos de indias, la PH20 humana contiene una región común de 340 aminoácidos con 57 aminoácidos conservados (ver por ejemplo, Arming et al. (1997) *Eur. J. Biochem.*, 247: 810-814). Los aminoácidos conservados incluyen cuatro residuos de cisteína que forman puentes de bisulfuro en residuos de aminoácido 25, 189, 203 y 316 en la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 2 (que corresponde a residuos 60, 224, 238 y 351 en la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 1). Los enlaces de disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio de hialuronidasa núcleo. Sin embargo, las cisteínas adicionales se requieren en el extremo carboxi por actividad catalítica de enzima neutra tal que los aminoácidos 36 hasta 464 de la SEQ ID NO: 1 contienen el dominio de hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activa. Además cuatro enlaces de disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C376 y C387; entre C381 y C435; entre C437 y C443; y entre C458 y C464 del polipéptido ejemplificado en la SEQ ID NO: 1 (que corresponde a residuos C341 y C352; entre C346 y C400; entre C402 y C408; y entre C423 y C429 del polipéptido maduro establecido en la SEQ ID NO: 2, respectivamente).

Además, otros residuos conservados se implican similarmente en enlace de substrato y catálisis. Los residuos de aminoácido en

000106

las posiciones de aminoácido 111, 113, 176, 249 y 252 que corresponden a residuos en la SEQ ID NO: 2 parece que se implican en la actividad de PH20, ya que la mutación en esta posición hace la enzima desprovista de actividad enzimática o deja únicamente actividad residual comparada con PH20 tipo natural que no contiene las mutaciones (ver por ejemplo, Arming et al. (1997) *Eur. J. Biochem.*, 247: 810-814).

Hay siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humano ejemplificados en la SEQ ID NO: 1. Los enlaces de disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 para formar el dominio de hialuronidasa del núcleo. Ya que los aminoácidos 36 hasta 464 de la SEQ ID NO: 1 contienen el dominio de hialuronidasa de PH20 humana mínimamente activa, el sitio N-490 de glicosilación ligado a N no se requiere para actividad de hialuronidasa correcta.

2. Hialuronidasa Soluble

Generalmente, la hialuronidasa en las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente son hialuronidasas solubles. Las hialuronidasas solubles, cuando se expresan en células, se secretan en los medios. La solubilidad se puede demostrar por distribución de la proteína en la fase acuosa de solución de Triton X-114. En consecuencia, se entiende que una hialuronidasa soluble no incluye cualquier hialuronidasa que contiene un ancla GPI, que presta el polipéptido enlazado a la membrana celular. Por ejemplo, PH20 humana de longitud completa (establecida en su forma madura como la SEQ ID NO: 2) contiene una ancla GPI y no es soluble. En contraste, polipéptidos de PH20

000107

de bovino y ovino no contienen una ancla GPI que es suficiente para enlazar a la ancla GPI, y por lo tanto se consideran que son proteínas soluble. Además, la hialuronidasa soluble que se incluye en las co-formulaciones proporcionadas en la presente
5 generalmente son proteínas sustancialmente purificadas. También, las hialuronidasas solubles conservan actividad de hialuronidasa. Por ejemplo, PH20 soluble humano conserva la actividad neutra.

Las hialuronidasas solubles incluyen hialuronidasas que no incluyen naturalmente una ancla GPI o una ancla suficiente para
10 enlazar a la membrana, que incluyendo, pero no se limita a, Hyal1, PH20 de bovino y PH20 de ovino, variantes alélicas de los mismos y otras variantes. También se incluyen entre hialuronidasa soluble cualquier hialuronidasa que se ha modificado para ser soluble. Por ejemplo, PH20 humano, que es normalmente membrana
15 anclada por medio de una ancla GPI, se puede hacer soluble por truncamiento de y eliminación de toda o una parte de la ancla GPI en la terminal C. Las hialuronidasas solubles también incluyen hialuronidasas activa neutral y activa ácida, sin embargo, las hialuronidasas activas neutrales se contemplan para usar en la
20 presente para propósitos de administración subcutánea.

Por lo tanto, ejemplo de una hialuronidasa soluble es PH20 de cualquier especie, tal como cualquiera establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31 y 32, o formas truncadas de los mismos que carecen de toda o una parte de el ancla GPI de terminal C, siempre y cuando la hialuronidasa es soluble y conserva la actividad de hialuronidasa. También incluidas entre hialuronidasas solubles son variantes alélicas u otras variantes de las formas solubles de cualquiera de las SEQ

ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30, 31 y 32, tal como formas truncadas de los mismos. Las variantes alélicas y otras variantes son conocidas por uno de experiencia en la técnica, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 5 95% o más identidad de secuencia a cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2, 11, 25, 27, 30 y 31, o formas truncadas de los mismos.

Típicamente, las co-formulaciones en la presente contienen una PH20 soluble humana. Aunque se puede utilizar la PH20 de otros animales, tales preparaciones son potencialmente 10 inmunogénicas, ya que son proteínas de animales. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestra sensibilización anterior secundaria a los alimentos ingeridos, y ya que estas son proteínas de animales, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización posterior. Por lo tanto, las preparaciones no 15 humanas no pueden ser adecuadas para uso crónico. Si las preparaciones no humanas se desean, se contempla en la presente que tales polipéptidos se pueden preparar para tener inmunogenicidad reducida. Tales modificaciones están dentro del nivel de alguien de experiencia en la técnica.

20 **a. PH20 Soluble Humana**

Ejemplos de una hialuronidasa soluble es la PH20 soluble humana. Las formas solubles de PH20 humana recombinante se han producido y se pueden incluir en las co-formulaciones descritas en la presente. La producción de tales formas solubles de PH20 se describe en la Solicitud de Patente de E.U.A. Nos. 2005-0260186 y 2006-0104968. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tiene truncamientos de terminal C para generar polipéptidos que contienen aminoácido 1 hasta aminoácido 464 o de

000109

la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NOS 1. Por ejemplo, las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tiene truncamientos de terminal C para generar polipéptidos que contienen aminoácido 1 hasta aminoácido 467 hasta 483, por ejemplo, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483. Cuando se expresa en las células de mamífero, la secuencia de señal de terminal N de aminoácido 35 se desdobla durante el procesamiento, y la forma madura de la proteína se secreta. Por lo tanto, los polipéptidos solubles maduros contienen al menos aminoácidos 36 hasta 464 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, los polipéptidos solubles maduros contienen aminoácidos 36 hasta 467 hasta 36 hasta 483 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo 36 hasta 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 de la SEQ ID NO: 1. Los mutantes de eliminación que terminan en la posición 477 hasta 483 de aminoácido (que corresponde al polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO: 1) exhiben mayor actividad de hialuronidasa secretada que la forma anclada GPI de longitud completa. Por lo tanto, hialuronidasas solubles ejemplares son aquellas que son 442, 443, 444, 445, 446 o 447 aminoácidos en longitud, tal como los establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-9, o variantes alélicas o de especies u otras variantes de los mismos.

b. PH20 soluble humana recombinante (rHuPH20)

Se han generado las formas solubles recombinantes de PH20 humana designadas como rHuPH20 y se pueden producir y purificar usando los métodos descritos en la presente. La generación de tales formas solubles de rHuPH20 se describen en la Solicitud de Patente de E.U.A. Nos. de Serie 11/065,716 y 11/238,171

000110

(publicadas como Solicitud de patente publicada de E.U.A. Nos. US20050260186 y US 20060104968), y en los Ejemplos 3 abajo. Ejemplar de tales polipéptidos son aquellos generados desde una molécula de ácido nucleico que codifican aminoácidos 1-482 establecidos en la SEQ ID NO: 3. Posterior al procesamiento traduccional remover la secuencia de señal del aminoácido 35, que resulta en la secreción de un rHuPH20 soluble de aminoácido 447 (SEQ ID NO: 4). El rHuPH20 purificado resultante puede ser heterogéneo debido a las peptidasas presentes en el medio de cultivo sobre la producción y purificación. Típicamente, rHuPH20 se produce en las células que facilitan la N-glicosilación correcta para conservar la actividad, tal como células CHO (por ejemplo, células DG44 CHO).

3. Glicosilación

La glicosilación, incluyendo glicosilación ligada a N- y O-, de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su actividad catalítica y estabilidad. Mientras que la alteración del tipo de glicano que modifica una glicoproteína puede tener efectos dramáticos en una antigenicidad de la proteína, plegamiento estructural, solubilidad, y estabilidad, la mayoría de las enzimas no se piensa que requieren la glicosilación por actividad de enzima óptima. Tales hialuronidasas son únicas a este respecto, en que la eliminación de glicosilación ligada a N puede resultar en inactivación completa cercana de la actividad de hialuronidasa. Para tales hialuronidasas, la presencia de glicanos ligados a N es crítica para generar una enzima activa.

Los oligosacáridos ligados a N caen en diversos tipos

000111

importantes (oligomanosa, complejo, híbrido, sulfatado), todos de los cuales tienen (Man) núcleos 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). La glicosilación en sitio an-Asn-Xaa-Cys- se ha reportado para coagulación de proteína C. En algunos casos, la hialuronidasa puede contener ambas ligaduras N-glicosídicas y O-glicosídicas. Por ejemplo, PH20 tiene oligosacáridos ligados a O así como oligosacáridos ligados a N. Hay siete sitios de glicosilación ligados a N potenciales en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humano ejemplificados en la SEQ ID NO: 1. Como se señaló anteriormente, la glicosilación ligada a N en N490 no se requiere para actividad de hialuronidasa.

4. Modificaciones de hialuronidasas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

Las hialuronidasas proporcionadas en las co-formulaciones se pueden modificar para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tal como incrementar su vida útil *in vivo* y/o actividades. La modificación de hialuronidasas para usar en co-formulaciones proporcionadas en la presente puede incluir enlazar, directamente o indirectamente por medio de un ligador, tal como covalente o por otra ligadura estable, un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (PEGilación (PEG)) o porción de sialilo, u otros de tales polímeros, tal como polímeros naturales o de azúcar.

La PEGilación de terapéuticos se conoce para incrementar la resistencia a la proteólisis, incrementa la vida útil de plasma, y disminuye la antigenicidad e inmunogenicidad. El enlace

000112

covalente u otro enlace estable (conjugación) de moléculas poliméricas, tal como porción de polietilenglicol (PEG), a la hialuronidasa por lo tanto puede impartir propiedades beneficiosas a la composición enzima-polímero resultante. Tales

5 propiedades incluyen biocompatibilidad mejorada, extensión de vida útil de proteína (y actividad enzimática) en la sangre, células y/o en otros tejidos dentro de un sujeto, protección efectiva de la proteína desde proteasas e hidrólisis, biodistribución mejorada, farmacocinéticos y/o farmacodinámicos

10 aumentados, y solubilidad al agua incrementada.

Los polímeros ejemplares que se pueden conjugar a la hialuronidasa, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tal como polioles (esto es, poli-OH), poliaminas (esto es, poli-NH₂) y ácidos de policarboxilo (esto es, poli-COOH), y además

15 heteropolímeros esto es polímeros que contienen uno o más diferentes grupos de acoplamiento por ejemplo, un grupo hidroxilo y grupos amina. Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tal como glicoles de polialquileno (PAG),

20 incluyendo glicoles de polipropileno (PEG), glicoles de metoxipolietileno (mPEG) y glicoles de polipropileno, éteres de glicidilo PEG (Epoxy-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG) glicoles de polietilen ramificados (PEGs), alcohol de polivinilo (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, poli-D,L-aminoácidos, anhídrido de polietilen-co-ácido maleico, anhídrido de poliestireno-co-ácido maleico, dextranos incluyendo carboximetil-dextranos, heparina, albumina homólogo, celulosas, incluyendo metilcellulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa

hidroxietilcelulosa carboxietilcelulosa y hidroxipropilcelulosa, hidrolisados de quitosan, almidones tal como hidroxietil-
 almidones e hidroxipropil-almidones, glicógeno, agarosas y
 derivados de los mismos, goma guar, pululano, inulina, goma
 5 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 polisacáridos tal como dextrano,
 10 pululano y similares, tienen pocos grupos reactivos capaces de
 reticular. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas
 no tóxicas tal como (m)polietilenglicol (mPEG) que se pueden
 conjugar covalentemente a la enzima que degrada hialuronano (por
 ejemplo, para enlazar grupos en la superficie de proteína) usando
 15 una química relativamente simple.

Las moléculas poliméricas adecuadas para enlazar a la enzima
 que degrada hialuronano incluyen, pero no se limitan a,
 polietilen glicol (PEG) y derivados PEG tal como glicoles de
 metoxi-polietilen (mPEG), éteres de PEG-glicidilo (Epoxy-PEG),
 20 oxicarbonilimidazol PEG (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, S (eds.)
 "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications"
 ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al, *J. Pharm.
 Pharmaceut. Sci.*, 3(1): 125-136, 2000; Harris, *Nature Reviews* 2:
 215 et seq. (2003); and Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37): 38118-24,
 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular
 típicamente que va desde alrededor de 3 kDa hasta alrededor de 60

kDa. En algunas modalidades la molécula polimérica que se conjuga a una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más que 60 kDa.

Diversos métodos para modificar polipéptidos al enlazar
5 covalentemente (conjugar) un PEG o derivado de PEG (esto es, "PEGilación") se conocen en la técnica (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
10 (ver por ejemplo, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476, 2002), enlace de múltiples porciones PEG a un sitio de conjugación simple (tal como por medio del uso de PEGs ramificados; ver por ejemplo, Veronese et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 177-180, 2002), PEGilación específica del sitio y/o
15 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 (1993) *Peptide Res.* 6:
20 142-6, 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) *Pharmacoterapia* 23 (8 Pt 2): 3S-8S). Los métodos y técnicas descritas en la técnica pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más que 10 PEG o derivados PEG enlazados a una molécula de proteína simple (ver por ejemplo, U.S. 2006/0104968).

000115

Numerosos reactivos para PEGilación se han descrito en la
 técnica. Tales reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG
 activado N-hidroxisuccinimidilo (NHS), mPEG succinimidilo, mPEG2-
 N-hidroxisuccinimida, alfa-metilbutanoato succinimidilo mPEG,
 5 propionato de succinimidilo mPEG, butanoato de succinimidilo
 mPEG, éster de succinimidilo del ácido 3-hidroxibutanoico
 carboximetilo mPEG, propionato de succinimidilo PEG
 homobifuncional, propionaldehído PEG homobifuncional,
 butiraldehído PEG homobifuncional, maleimida PEG, hidrazida PEG,
 10 PEG p-nitrofenil-carbonato, carbonato de mPEG-benzotriazol, PEG
 propionaldehído, butiraldehído mPEG, butiraldehído mPEG2
 ramificado, acetilo mPEG, piperidona mPEG, metilcetona mPEG,
 maleimida "sin ligadura" mPEG, sulfona de vinilo mPEG, tiol mPEG,
 ortopiridiltioéster mPEG, disulfuro de ortopiridilo mPEG, Fmoc-
 15 PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, PEG-NHS vinilsulfona, PEG-NHS de acrilato,
 PEG-NHS de fluoresceína, y PEG-NHS biotina (ver por ejemplo,
 Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6: 62-69, 1995; Veronese et
 al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12: 197-207, 1997; U.S.
 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S.
 20 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.

000116

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).

5 **E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos que codifican una
Hialuronidasa soluble y Polipéptidos De los mismos**

10 Los polipéptidos de una hialuronidasa soluble establecidos
en la presente, pueden obtenerse por métodos bien conocidos en la
técnica para purificación de proteína y expresión de proteína
recombinante. Puede usarse cualquier método conocido para
15 aquellos de experiencia en la técnica para identificación de
ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Cualquier método
disponible en la técnica puede usarse para obtener un cADN de
longitud completa (esto es, que abarca la región de codificación
completa) o clon de ADN genómico que codifica una hialuronidasa,
15 tal como de una fuente de célula o tejido. Las hialuronidasas
solubles modificadas o variantes, pueden prepararse por
ingeniería de un polipéptido de tipo natural, tal como por
mutagénesis dirigida al sitio. Típicamente, las hialuronidasas,
20 que incluyen hialuronidasas solubles tal como rHuPH20, usadas en
las co-formulaciones proporcionadas en la presente pueden
producirse recombinantemente o pueden purificarse o parcialmente
purificarse de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, de
extractos de pruebas.

Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando
cualquiera de los métodos disponibles conocidos en la técnica
para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos
incluyen amplificación PCR de ácidos nucleicos y cribado de

000117

bibliotecas, que incluyen cribado de hibridización de ácido nucleico, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.

Los métodos para amplificación de ácidos nucleicos pueden
5 usarse para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, que incluye por ejemplo, métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede usarse como un material de partida del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico que codifica el
10 polipéptido deseado. Por ejemplo, preparaciones de ADN y mRNA, extractos celulares, extractos de tejido, muestras de fluido (por ejemplo sangre, suero, saliva), muestras de sujetos saludables y/o enfermos pueden usarse en métodos de amplificación. Las colecciones de ácido nucleico también pueden usarse como una
15 fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse basados en secuencias expresadas de las cuales se genera un polipéptido deseado. Los cebadores pueden diseñarse basados en retro-traducción de una secuencia de
20 aminoácidos de polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden procesarse por secuencia y confirmarse para codificar un polipéptido deseado.

Las secuencias de nucleótido adicionales pueden unirse a una molécula de ácido nucleico codificada por polipéptido, que incluye secuencias de ligadura que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las

000118

secuencias de ADN que codifican la proteína de núcleo. Adicionalmente, las secuencias de nucleótido adicionales que especifican elementos de ADN funcionales 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 intracelular, y secuencias de secreción, por ejemplo secuencias de señal heterólogas, diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Tales secuencias se conocen para aquellos de experiencia en la técnica. Las secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican las regiones de enlace de proteína también pueden ligarse a moléculas de ácido nucleico codificadas por enzimas. 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. Por ejemplo, las enzimas pueden ligarse a porciones PEG.

Además, pueden agregarse etiquetas u otras porciones, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación de afinidad del polipéptido. Por ejemplo, las secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta de epítipo u otro marcador detectable también pueden ligarse a moléculas de ácido nucleico codificadas por enzimas. Los ejemplares de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO:54) o etiqueta Flag (DYKDDDDK;

SEQ ID NO:55).

Los ácidos nucleicos aislados e identificados luego pueden insertarse en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un número grande de sistemas de vector-hospedero conocidos en la técnica. Los vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedera usada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tal como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmido 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. 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. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede producirse por secuencias de nucleótido ligadas (ligaduras) en las terminaciones de ADN; estas ligaduras ligadas pueden contener oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector desdoblado y gen de proteína pueden modificarse por prolongación homopolimérica. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células hospederas por medio de, por ejemplo, transformación, transfección, infección,

000120

electroporación y sonoporación, de modo 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 sintetizada permite generación de copias múltiples del gen. De esta manera, el gen puede obtenerse en cantidades grandes al hacer crecer transformantes, aislar las moléculas de ADN recombinantes de los transformantes y, cuando es necesario, recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado. Generalmente, las hialuronidasas, que incluyen formas solubles de PH20, se producen usando sistemas de expresión de proteína que facilitan N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido mantiene la actividad, ya que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y estabilidad de hialuronidasas. Tales células incluyen, por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (por ejemplo células CHO DG44).

1. Vectores y células

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

sus regiones de flaqueo.

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
5 adecuados para uso ahí.

Se proporcionan células procarióticas y eucarióticas, que incluyen células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células de hongos, Archea, células de planta, células de insecto
10 y células de animal. Las células se usan para producir una proteína de las mismas al hacer crecer las células descritas arriba bajo condiciones por las cuales la proteína codificada se expresa por la célula, y recupera la proteína expresada. Para
15 propósitos en la presente, por ejemplo, la enzima puede secretarse en el medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de hialuronidasa soluble acoplado a la secuencia de señal heteróloga o nativa, así como
20 copias múltiples de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para expresión de la proteína de enzima en la célula o de manera que la proteína de enzima se expresa como una proteína secretada.

Una variedad de sistemas hospedero-vector puede usarse para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de célula mamífera 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 levadura que contiene
000122

vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema hospedero-vector usado, puede usarse cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Cualquiera de los métodos conocidos para aquellos de experiencia en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control transcripcionales/traduccionales apropiadas y secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinante *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 las mismas, puede regularse por una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que los genes o fragmentos de la misma 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 a el promotor temprano SV40 (Bernoist and Chambon, Nature 280:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición de terminal larga 3' del virus de sarcoma Rous (Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de

000123

metalotioneina (Brinster et al, Nature 296:39-42 (1982));
vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de β -
lactamasa (Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5543)
o el promotor tac (DeBoer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
5 80:21-25 (1983)); ver también "Useful Proteins from Recombinant
Bacteria": in Scientific American 242:19-94 (1980)); vectores de
expresión de planta que contienen el promotor de nopalina
sintetasa (Herrera-Estrella et al, Nature 303:209-213 (1984)) o
el promotor de ARN 35S del virus de mosaico de coliflor (Gardner
10 et al, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la
ribulosa bisfosfato carboxilasa de enzima fotosintética (Herrera-
Estrella et al, Nature 310:115-120 (1984)); elementos del
promotor de levadura y otros hongos tal como el promotor Gal4, el
promotor de deshidrogenasa de alcohol, el promotor de
15 fosfoglicerol cinasa, el promotor de fosfatasa alcalina, y las
siguientes regiones de control transcripcionales de animal que
muestran especificidad de tejido y se han usado en animales
transgénicos: región de control del gen de elastasa I que está
activa en células acinar pancreáticas (Swift et al, Cell 35:639-
20 646 (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 está activa en células
beta pancreáticas (Hanahan et al, Nature 375:115-122 (1985)),
región de control del gen de inmunoglobulina que está activa en
células linfóide (Grosschedl et al, Cell 35:647-658 (1984); Adams
et al, Nature 375:533-538 (1985); Alexander et al, Mol. Cell Biol
7:1436-1444 (1987)), región de control del virus de tumor mamario
de ratón que está activa en células testiculares, mama, linfóide

y mastocitos (Leder et al, Cell 45:485-495 (1986)), región de control del gen de albúmina que está activa en el hígado (Pinckert et al, Genes and Devel. 7:268-276 (1987)), región de control del gen alfa-fetoproteína que está activa en el hígado (Krumlauf et al, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al, Science 235:53-58 1987)), región de control del gen alfa-1 antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey et al, Genes and Devel. 7:161-171 (1987)), región de control del gen de globina beta que está activa en células mieloide (Magram et al, Nature 375:338-340 (1985); Kollias et al, Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de proteína básica de mielina que está activa en células oligodendrocitas del cerebro (Readhead et al, Cell 45:703-712 (1987)), región de control del gen 2 de cadena ligera de miosina que está activa en el músculo esquelético (Shani, Nature 374:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona liberada gonadotrófica que está activa en gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, se usa un vector que contiene un promotor operablemente ligado a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, 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 antibiótica). Los vectores de plásmido ejemplares para transformación de células *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 de

000125

fago (reconocido por polimerasa de ARN *E. coli*) y un módulo de represión operador lac doble para proporcionar expresión de nivel alto, herméticamente 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 transcripcionales t_0 y T1, origen ColE1 de replicación, y un gen beta-lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE permiten colocación de una etiqueta 6xHis en ya sea 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 se proporcionan para la expresión de proteína etiquetadas 6xHis de terminal N. Otros vectores de plásmido ejemplares para transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (ver, Patente de E.U.A. 4,952,496; disponibles 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 *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder His-Tag™ para uso en purificación con una columna His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región promotora T7-lac y el terminador T7.

El ejemplo de un vector para expresión de célula mamífera es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se

000126

derivó de la columna de vector pCI (Promega). Esto contiene ADN que codifica el gen de resistencia Beta-lactamasa (AmpR), un origen F1 de replicación, una región potenciador/promotora temprana inmediata de citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación posterior SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de reductasa de dihidrofolato de ratón (DHFR).

2. Expresión

Los polipéptidos de hialuronidasa solubles pueden producirse por cualquier método conocido para aquellos de experiencia en la técnica que incluyen métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas, tal como por ejemplo, necesarias para administración y tratamiento. Los hospederos de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tal como células *E. coli*, levadura, plantas, insecto, células mamíferas, que incluyen líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospederos de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteína así como los tipos de modificaciones post-traduccionales que se presentan en las proteínas expresadas. La elección de hospedero de expresión puede hacerse basadas en estos y otros factores, tal como consideraciones reguladoras y de seguridad, costos de producción y la necesidad y los métodos para purificación.

Muchos vectores de expresión están disponibles y se conocen para aquellos de experiencia en la técnica y pueden usarse para

expresión de proteínas. La elección de vector de expresión se influenciará por la elección del sistema de expresión hospedera. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales, y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión que se usan para transformación estable típicamente tienen un marcador seleccionable que permite 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 también pueden utilizarse o expresarse como fusiones de proteína. Por ejemplo, una fusión de enzima puede generarse para 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 his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteína y/o asociación de membrana.

a. Células Procarióticas

Las procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir cantidades grandes de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida bien conocida para aquellos de experiencia en la técnica. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir niveles altos de expresión de proteína y para expresar proteínas que muestran

000128

alguna toxicidad para las células hospederas. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor PL que regula la temperatura.

5 Las proteínas, tal como cualquiera proporcionada 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 reductores tales como
10 ditiotreitól y β -mercaptoetanol y desnaturalizantes, tal como guanidina-HCl y urea pueden usarse para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporcionan un ambiente oxidante e isomerasas de disulfuro y tipo chaperonina y puede
15 llevar a la producción de de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona a la proteína para expresarse que dirige la proteína al periplasma. El líder luego se remueve por peptidasas de señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líder dirigidas periplásmicas incluyen el líder pelB
20 del gen pectato liasa y el líder derivado del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite carencia de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan pueden obtenerse del periplasma por lisis osmótica. La expresión similar a citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y los desnaturalizantes y agentes reductores pueden usarse para facilitar la solubilización y repliegue. La

000123

temperatura de inducción y crecimiento también pueden influir en los niveles de expresión y solubilidad, típicamente se usan temperaturas entre 25°C y 37°C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosilados. De esta manera, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, la glicosilación puede agregarse *in vitro* después de la purificación de las células hospederas.

b. Células de Levadura

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospederos de expresión de levadura bien conocidos que pueden usarse para producción de proteínas, tales como cualquiera de los descritos en la presente. La levadura puede transformarse con vectores de replicación episomal o por integración cromosomal estable por recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión del gen. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneína, tal como CUP1, AOX1 u otra *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 tal como isomerasa de disulfuro de proteína y Bip 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 señal de secreción del

factor alfa tipo acoplamiento de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la glucoamilasa *Arxula adeninivorans*. Un sitio de escisión de proteasa tal como para la proteasa Kex-2, puede prepararse por ingeniería para remover las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados ya que salen de la trayectoria de secreción. La levadura también es capaz de glicosilación en porciones Asn-X-Ser/Thr.

c. Células de Insecto

Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para expresar los polipéptidos tal como polipéptidos de hialuronidasa. Las células de insecto expresan niveles altos de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones post-traduccionales usadas por eucariotas superiores. El baculovirus tiene un intervalo de hospedero restrictivo que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para la expresión de nivel alto tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen los baculovirus tal como virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de polihedrosis nuclear *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para expresión de nivel alto, la secuencia de nucleótido de la molécula a expresarse se fusiona inmediatamente

corriente abajo del codón de inicio de polihedrina del virus. Las señales de secreción mamífera se procesan exactamente en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia*
5 *unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de célula mamífera.

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

d. Células Mamíferas

Los sistemas de expresión mamíferos pueden usarse para
20 expresar proteínas que incluyen polipéptidos de hialuronidasa solubles. Los constructos de expresión pueden transferirse a células mamíferas por infección vírica tal como adenovirus o por transferencia de ADN directa tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células mamíferas típicamente incluyen un sitio de cierre de mRNA, un recuadro TATA, una secuencia de inicio traduccional (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Los

elementos IRES también pueden agregarse para permitir la expresión bicistrónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores a menudo incluyen promotores-potenciadores transcripcionales para expresión de nivel alto, por ejemplo el promotor-potenciador SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición de terminal larga de virus de sarcoma Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos celulares. Los promotores de tipo celular y tejido y regiones potenciadoras también pueden usarse para expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquellos de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albumina, fetoproteína alfa, antitripsina alfa 1, beta globina, proteína básica de mielina, cadena ligera de miosina 2, y control del gen de la hormona liberada gonadotrópica. Los marcadores seleccionables pueden usarse para seleccionar y mantener células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, fosfotransferasa de higromicina B, desaminasa de adenosina, xantina-guanina fosforibosil transferasa, fosfotransferasa de aminoglicósido, 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 tal como TCR- ζ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie celular.

Muchas líneas celulares están disponibles para expresión

000133

mamífera que incluyen células de ratón, rata, humano, mono, gallina y hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NSO de ratón (no secretadas) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas para el 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 (Pharm et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.). Las líneas celulares también están disponibles que se adaptan para crecer en medios especiales optimizados para expresión máxima. Por ejemplo, células CHO DG44 se adaptan para crecer en cultivo de suspensión en un medio libre de producto animal, químicamente definido.

e. Plantas

Las células de plantas transgénicas y plantas pueden usarse para expresar proteínas tales como cualesquiera descritas en la presente. Los constructos de expresión típicamente se transfieren a plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo de microproyectil y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterium.

Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación transcripcional y elementos de control traduccionales. Los vectores de expresión y técnicas de transformación se dividen

000134

usualmente entre hospederos dicotiledóneos, tal como *Arabidopsis* y tabaco, y hospederos monocotiledóneos, tal como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de planta usados para expresión incluyen el promotor del virus mosaico de coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores seleccionables tales como higromicina, isomerasa de fosfomanosa y fosfotransferasa de neomicina son a menudo usados para facilitar selección y mantenimiento de células transformadas. Las células de planta transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregadas (tejido de callo) o regeneradas en plantas enteras. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas preparadas por ingeniería para producir polipéptidos de hialuronidasa. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células mamíferas, esto puede influir la elección de proteína producida en estos hospederos.

3. Técnicas de Purificación

El método para purificación de polipéptidos, que incluye los polipéptidos de hialuronidasa solubles u otras proteínas, de células hospederas dependerá de las células hospederas elegidas y sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente del medio de cultivo después de remover las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificadas del extracto. Cuando los organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos se usan para expresión, los tejidos u órganos pueden

usarse como material de partida para hacer un extracto celular lisado. Adicionalmente, la producción animal transgénica puede incluir la producción de los polipéptidos en leche o huevos, que puede recolectarse, y si es necesario, las proteínas pueden
5 extraerse y purificarse además usando métodos estándares en la técnica.

Las proteínas, tales como polipéptidos de hialuronidasa solubles, pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteína estándares conocidas en la técnica que incluyen pero no
10 se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de exclusión de tamaño y fracción de tamaño, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónica, tal como intercambio de anión. Las técnicas de purificación de afinidad también pueden utilizarse para mejorar la eficiencia y pureza de las
15 preparaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que enlazan enzimas de hialuronidasa en purificación de afinidad. Los constructos de expresión también pueden prepararse por ingeniería para agregar una etiqueta de afinidad para una proteína tal como un epítipo myc, fusión GST o
20 His₆ y afinidad purificada con anticuerpo myc, resina de glutatona y resina Ni, respectivamente. La pureza puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica que incluye electroforesis de gel y técnicas de tinción y , espectrofotométricas.

F. Preparación, Formulación y Administración de InmunoGlobulinas y Polipéptidos de Hialuronidasa Solubles

Se proporcionan en la presente co-formulaciones de IG y

000136

hialuronidasa que son estables como una formulación líquida durante periodos prolongados de tiempo de al menos 6 meses a temperaturas hasta 32°C, por ejemplo, en el intervalo desde a o alrededor de 0°C hasta 32°C. La estabilidad incrementada se caracteriza por tiempo de almacenamiento mejorado, fragmentación disminuida, formación de agregado disminuida, formación de dímero disminuida o/y decoloración disminuida, mientras que mantiene la actividad del IG y hialuronidasa. Tales co-formulaciones pueden proporcionarse como formulación líquida "lista para uso" sin reconstitución adicional y/o sin ningún requerimiento para dilución adicional. Las co-formulaciones estables resultantes pueden ofrecerse convenientemente a médicos o pacientes en formas de dosificaciones para inyección o administración directa. Por ejemplo, las co-formulaciones pueden infundirse o inyectarse en el hogar o cualquier lugar.

Las hialuronidasas solubles que se co-formulan con globulina inmunitaria permiten suministro potenciado de globulina inmunitaria a sitios deseados dentro del cuerpo al incrementar la biodisponibilidad de la globulina inmunitaria. De esta manera, las co-formulaciones alcanzan concentraciones elevadas y/o alcanzadas más rápidamente de la globulina inmunitaria después de la administración subcutánea comparada con métodos convencionales de administración subcutánea, para proporcionar, por ejemplo, una respuesta más potente y/o más rápida para una dosis dada. Además, las co-formulaciones de IG que contienen hialuronidasas solubles también permiten dosis inferiores de IG para administrarse que alcanzan una respuesta dada con una dosis inferior de IG administrado. Finalmente, la capacidad de una hialuronidasa

soluble para aumentar el flujo de fluido de volumen en y cerca de un sitio de inyección o infusión también puede mejorar otros aspectos de suministro farmacológico asociado. Por ejemplo, el incremento en flujo de fluido de volumen puede ayudar a permitir
5 que el volumen del fluido inyectado sea dispersado más fácilmente del sitio de inyección (reduciendo potencialmente el dolor u otras consecuencias adversas de inyección). Esto es particularmente importante para infusiones subcutáneas para permitir dosis superiores para administrarse. Además de la
10 biodisponibilidad incrementada, la co-formulación de IG con hialuronidasa se proporciona para una ruta más segura o más conveniente de administración comparada con rutas intravenosas convencionales de administración.

Las co-formulaciones proporcionadas en la presente son
15 estable durante periodos prolongados de tiempo, que incluyen a temperaturas variadas. Por ejemplo, las co-formulaciones que se proporcionan en la presente invención son estables y mantienen la actividad del IG y temperaturas de hialuronidasa hasta 32°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, las co-formulaciones son
20 estables a temperaturas del "refrigerador", por ejemplo a 2°C hasta 8°C, tal como a o alrededor de 4°C, durante al menos 6 meses hasta 4 años, tal como 1 año hasta 2 años, por ejemplo 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años o al menos 4 años o más. En otro ejemplo, las co-formulaciones son estables y mantienen la actividad a temperatura ambiente, por ejemplo a 18°C hasta 32°C, generalmente 20°C hasta 32°C, tal como 28°C hasta 32°C, durante al menos 6 meses hasta 1 año, por ejemplo 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9

meses, o al menos 1 año o más.

En particular, las co-formulaciones estables muestran niveles bajos hasta no detectables de agregación y/o fragmentación de IG después de almacenamiento durante periodos de tiempo definidos. Los métodos para evaluar agregación y fragmentación se conocen para alguien de experiencia en la técnica, y se ejemplifican en la Sección G a continuación. Generalmente, no más de 0.5% hasta 5% de IG, por ejemplo, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% y generalmente no más de 0.5% de IG en la co-formulación forma un agregado, como se mide por HPSEC u otros métodos, después de almacenamiento durante los periodos de tiempo definidos como se establecen arriba.

Además, la IG e hialuronidasa en las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente mantiene una o más actividades de la actividad inicial del IG e hialuronidasa antes del almacenamiento. Alguien de experiencia en la técnica está familiarizado con actividades de IG e hialuronidasa y puede evaluar tales actividades. La sección G proporciona actividades y ensayos ejemplares para evaluar la actividad. Típicamente, las co-formulaciones líquidas estables proporcionadas en la presente mantienen después de almacenamiento al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o más de la actividad inicial de la proteína antes del almacenamiento, generalmente al menos 70% hasta 95% de la actividad inicial. Por ejemplo las co-formulaciones líquidas estables mantienen después del almacenamiento más de 70%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 95%, más de 98%, más de 99%, o más de 99.5% de la actividad inicial de la proteína respectiva

000133

antes del almacenamiento.

1. Formulaciones y Dosificaciones

Las co-formulaciones proporcionadas en la presente se
5 formulan como líquidos. Las co-formulaciones contienen globulina
inmunitaria, hialuronidasa, al menos 0.05 M de una sal de cloruro
de metal alcalino, por ejemplo, al menos cloruro de sodio 0.05 M
(NaCl o sal) o cloruro de potasio 0.05 M (KCl). Las co-
formulaciones también se ajustan en pH para limitar la agregación
10 y mantienen la actividad del IG e hialuronidasa. En algunos
ejemplos, las co-formulaciones no contienen otros ingredientes
excepto agua o solventes adecuados. En otros ejemplos, las co-
formulaciones contienen además diluyentes, portadores u otros
excipientes.

15 Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones
farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en
la técnica (ver por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical
Dosage Forms, Cuarta Edición, 1985, 126). Las composiciones
farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de aprobaciones
20 para una agencia reguladora u otra agente preparada de acuerdo
con farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y en
humanos. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Las co-formulaciones pueden proporcionarse como una
preparación farmacéutica en forma líquida como soluciones,
jarabes o suspensiones. En forma líquida, las preparaciones
farmacéuticas pueden proporcionarse como una preparación
concentrada para diluirse a una concentración terapéuticamente
efectiva antes del uso. Generalmente, las preparaciones se

000140

proporcionan en una forma de dosificación que no requiere dilución para 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 comestible hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, o aceites vegetables 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 adecuado antes del uso.

El pH de las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente es de manera que la IG en la co-formulación no se agregue y/o la IG y hialuronidasa conserven actividad como se describe en la Sección G. El pH óptimo puede obtenerse por técnicas de formulación conocidas para aquellos experimentados en la técnica. Por ejemplo, el pH óptimo puede determinarse al evaluar la agregación y actividad bajo condiciones de pH diferidas usando varios métodos conocidos para alguien de experiencia en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Sección G. Tales ensayos o evaluación incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión de tamaño, determinaciones HSPEC, datos de estabilidad de calor, titulaciones anti-complemento de las varias preparaciones y/o ensayos de la actividad de hialuronidasa. Típicamente, en las co-formulaciones proporcionadas en la presente el pH puede estar en el intervalo desde 4.0 hasta 8.0 como se mide en la solución concentrada de la

co-formulación. Generalmente, dentro de este intervalo, un pH inferior se desea, sin embargo, para asegurar el contenido de monómero máximo. En consecuencia, las co-formulaciones proporcionadas en la presente típicamente tienen un pH que es al menos o alrededor de 4.0 hasta 7.4, generalmente al menos o alrededor de 4.0 hasta 6.0, y típicamente 4.4 hasta 4.9. Como se indica, el pH indicado se mide en la solución concentrada de la formulación. El pH puede ajustarse usando agentes acidificantes para disminuir el pH o agentes alcalinizantes para incrementar el pH. Los agentes acidificantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, solución de fosfato de sodio monobásica, y ácido fosfórico. Los agentes alcalinizantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, solución de fosfato de sodio dibásico, carbonato de sodio, o hidróxido de sodio.

Cualquier solución amortiguadora puede usarse en la preparación de la formulación líquida proporcionada en la presente siempre que no afecte adversamente la estabilidad de la co-formulación, y soporte el requisito de intervalo de pH requerido. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras particularmente adecuadas incluyen succinato, acetato, soluciones amortiguadoras de fosfato, citrato, aconitato, malato y carbonato. Aquellos de experiencia en la técnica, sin embargo, reconocerán que tales formulaciones proporcionadas en la presente no se limitan a una solución amortiguadora particular, siempre que la solución amortiguadora proporcione un grado aceptable de estabilidad de pH, o "capacidad de solución amortiguadora" en el intervalo indicado. Generalmente, una solución amortiguadora

tiene una capacidad de solución amortiguadora adecuada dentro de alrededor de 1 unidad de pH de su pK (Lachman et al. 1986). La solución amortiguadora apropiada puede estimarse basada en tabulaciones pK publicadas o puede determinarse empíricamente por métodos bien conocidos en la técnica. El pH de la solución puede ajustarse al punto final deseado dentro del intervalo como se describe arriba, por ejemplo, usando cualquier ácido o base aceptable.

a. Globulina inmunitaria

Se proporciona el IG en las co-formulaciones a una concentración que es o está alrededor de 5% hasta 22% p/v, por ejemplo, que es o está alrededor de 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 120 mg/mL, 150 mg/mL, 180 mg/mL, 200 mg/mL, 220 mg/mL, 250 mg/mL o más. Generalmente, el IG en la co-formulación se proporciona en una cantidad que es al menos 10% (100 mg/mL) hasta 20% (200 mg/mL), por ejemplo, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% o más.

Las preparaciones de globulina inmunitaria proporcionadas en la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas para uso de dosificación sencilla o múltiple. Típicamente, como se indica en cualquier lugar en la presente, el IG en la co-formulación se formula en una cantidad de manera que está lista para uso y que no es necesaria dilución adicional. Dependiendo de si la co-formulación se proporciona como una formulación de dosificación sencilla o múltiple, alguien de experiencia en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad exacta de IG en la co-formulación.

000143

Generalmente, la globulina inmunitaria se proporciona en una cantidad terapéuticamente efectiva para el régimen de dosificación particular. La concentración terapéuticamente efectiva puede determinarse empíricamente al probar los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tal como los ensayos proporcionados en la presente. La concentración de una globulina inmunitaria seleccionada en la composición depende de tasas de absorción, inactivación y excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación, y cantidad administrada así como otros factores conocidos para aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa y duración del tratamiento es una función del tejido que se trata y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Se observará que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se entenderá además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el paso del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en la presente son sólo ejemplares y no se pretenden para limitar el alcance de los mismos. La cantidad de una preparación de globulina inmunitaria seleccionada a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo una enfermedad o afección tratable con IG, puede determinarse por técnicas clínicas estándares. Además

ensayos *in vitro* y modelos animales pueden emplearse para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. Aquí, el régimen preciso, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la preparación de globulina inmunitaria particular, 5 el régimen y programa de dosificación con la hialuronidasa soluble, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratarse y la seriedad de la enfermedad.

Por ejemplo, las preparaciones IG pueden formularse en composiciones farmacéuticas para alcanzar regímenes de 10 dosificación (dosis y frecuencias) para las cuales las preparaciones intravenosas actuales (IVIG) se preparan y administran para enfermedades o afecciones tratables con IG particular. Alguien de experiencia en la técnica está familiarizado con regímenes de dosificación para administración 15 IVIG de enfermedades o afecciones particulares. Por ejemplo, la Sección H a continuación proporciona regímenes ejemplares de dosificación (dosis y frecuencias) de IG para enfermedades y afecciones particulares. Otros regímenes de dosificación son bien conocidos para aquellos de experiencia en la técnica. Si es, 20 necesario, una dosificación particular y duración y protocolo de tratamiento puede determinarse o extrapolarse empíricamente.

Por ejemplo, las dosis ejemplares de globulina inmunitaria intravenosamente administrada pueden usarse como un punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden determinarse basados en una variedad de factores, tal como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción,

000145

combinación de fármaco, la severidad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente para la enfermedad y el juicio del medio que lo trata. Generalmente, las dosificaciones de globulina inmunitaria son desde o alrededor de 100 mg por kg de peso corporal (esto es 100 mg/kg PC) hasta 2 g/kg de PC. Se entiende que la cantidad a administrar será una función de la indicación tratada, y posiblemente efectos colaterales que se tolerarán. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

En un ejemplo, la IG se proporciona en una cantidad que permite la administración subcutánea de una dosis equivalente a una dosis IV una vez al mes para la indicación particular que se trata. En tal ejemplo, las preparaciones de globulina inmunitaria pueden formularse para administración de dosis sencilla en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis una vez al mes, pero pueden proporcionarse en cantidades menores para administraciones de dosificación múltiples. Por ejemplo, dosis una vez al mes de preparaciones IG pueden administrarse diariamente, semanalmente, bisemanalmente o una vez al mes. Los regímenes de dosificación pueden continuarse durante meses o años. La dosis IV una vez al mes particular es una función de la enfermedad a tratarse, y de esta manera puede variar.

Los intervalos de dosificaciones sencillos ejemplares, en particular para administración subcutánea de IG, son desde en o alrededor de 1 gramo (g) hasta 200 g, por ejemplo, 1 gramo (g), 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g o 200 g. La dosificación particular y formulación de la misma dependen de la indicación e individuo. Por ejemplo, las

dosificaciones pueden administrarse en 50 mg/kg de peso corporal (PC) hasta 600 mg/kg, PC, por ejemplo 50 mg/kg de peso corporal (PC), 100 mg/kg PC, 200 mg/kg de PC, 300 mg/kg de PC, 400 mg/kg de PC, 500 mg/kg de PC, 600 mg/kg de PC, o más. Si la dosificación necesaria puede determinarse empíricamente. Para alcanzar tales dosificaciones, los volúmenes de co-formulaciones que contienen IG administrados subcutáneamente pueden ser en o alrededor de 10 mL hasta 700 mL, por ejemplo, 100 mL hasta 500 mL, tal como 200 mL hasta 400 mL. Por ejemplo, los volúmenes de co-fomulaciones que contienen IG administrados subcutáneamente pueden estar en o alrededor de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml o más para administración de dosificación sencilla. Por ejemplo, una co-formulación IG líquida al 10% (100 mg/ml) para indicaciones descritas en la presente puede administrarse en un volumen de 200 ml hasta 700 ml para alcanzar una dosificación sencilla de 20 g hasta 70 g de IG. En otro ejemplo, una co-formulación IG líquida al 20% (200 mg/mL) para indicaciones descritas en la presente puede administrarse en un volumen de 100 mL hasta 350 mL para alcanzar una dosificación sencilla similar de 20 g hasta 70 g de IG. Como se indica, IG puede proporcionarse en cantidades menores en la co-formulación para administraciones de dosificación múltiples.

b. Hialuronidasa

La hialuronidasa seleccionada, en particular una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20, se incluye en la co-formulación a una concentración que está a o alrededor de 50 U/mL

000'47

hasta 300 U/mL, por ejemplo 50 U/ml, 75 U/mL, 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/mL, 400 U/ml o 500 U/ml, típicamente al menos 100 U/mL hasta 300 U/mL, generalmente a una concentración que es 75 U/mL hasta 350 U/mL. Si se desea, la hialuronidasa puede proporcionarse en una forma más concentrada, por ejemplo en o alrededor de 1000 U/mL hasta 5000 U/mL, tal como 1000 U/ml, 1500 Unidades/ml, 2000 U/ml, 4000 U/ml o 5000 U/ml.

La hialuronidasa en la co-formulación puede formularse como las composiciones farmacéuticas para administración de dosificación sencilla o múltiple. Como se indica arriba para IG, la hialuronidasa en la co-formulación típicamente se formula en una cantidad que está lista para uso de manera que no es necesaria la dilución adicional. Dependiendo de si la formulación se proporciona como una forma de dosificación sencilla o múltiple, alguien de experiencia en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad exacta de hialuronidasa para incluir en la co-formulación.

Generalmente, la hialuronidasa seleccionada, en particular una hialuronidasa soluble, por ejemplo, rHuPH20, se incluye en la co-formulación en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil de la IG 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 tales 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 (EUA), 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 extrapolarse de los mismos para dosificaciones para humanos.

Por ejemplo, una dosis terapéuticamente efectiva de hialuronidasa para administración de dosificación sencilla está en o alrededor de 500 Unidades hasta 500,000 Unidades, por ejemplo, 1000 Unidades hasta 100,000 Unidades de hialuronidasa. Por ejemplo, la hialuronidasa puede administrarse, en particular para administración subcutánea, en o alrededor de 500 Unidades, 1000 Unidades, 2000 Unidades, 5000 Unidades, 10,000 Unidades, 30,000 Unidades, 40,000 Unidades, 50,000 Unidades, 60,000 Unidades, 70,000 Unidades, 80,000 Unidades, 90,000 Unidades, 100,000 Unidades o más. Como se indica, la hialuronidasa puede proporcionarse en cantidades menores en la co-formulación para administraciones de dosificación múltiples.

En algunos ejemplos, las dosificaciones pueden proporcionarse como una relación IG administrada. Por ejemplo, la hialuronidasa puede administrarse en 10 U/gramo (g) hasta 2000

U/g o más de IG, por ejemplo, en o alrededor de 10 U/g, 20 U/g, 30U/g, 40 U/g, 50 U/g, 60 U/g, 70 U/g, 80 U/g, 90 U/g, 100 U/g, 150 U/g, 200 U/g, 250 U/g, 300 U/g, 400 U/g, 500 U/g, 1000 U/g, 1500 U/g, 2000 U/g, 3000 U/g IG o más. En general, la relación de hialuronidasa para IG en un producto co-formulado es mayor que la relación cuando los mismos productos (IG y hialuronidasa) y la misma cantidad de IG se administran subcutáneamente de forma separada, por ejemplo, en una administración de borde principal. De esta manera, generalmente la relación es al menos 100 U/g, y generalmente 250 U/g o más, por ejemplo 100 U/g hasta 3000 U/g IG, tal como 250 U/g hasta 1000 U/g, y en particular 250U/g hasta 750 U/g, tal como 500 U/g IG. Por ejemplo, una co-formulación que contiene 100 U/mL de hialuronidasa, cuando se co-formula con un IG al 20% (200 mg/mL), se proporciona a una relación que es o está alrededor de 500 U/g de IG. Típicamente, los volúmenes administrados subcutáneamente pueden estar en o alrededor de 10 mL hasta 700 mL, tal como 50 mL hasta 500 mL, por ejemplo 100 mL hasta 400 mL para una administración de dosificación sencilla. Por ejemplo, los volúmenes administrados subcutáneamente pueden estar en o alrededor de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml o más para administración de dosificación sencilla.

c. Sal de cloruro de metal alcalino

La co-formulación proporcionada en la presente contiene una sal de cloruro de metal alcalino que es al menos 0.05 M. La sal de cloruro de metal alcalino incluye, pero no se limita a, cloruro de sodio (NaCl) o cloruro de potasio (KCl). Típicamente,

la sal de cloruro de metal alcalino, por ejemplo NaCl o KCl, se proporciona para mantener la estabilidad y actividad de la hialuronidasa. La cantidad exacta de sal puede determinarse empíricamente por alguien de experiencia en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de sal en las formulaciones puede determinarse al evaluar la agregación y actividad bajo condiciones de sal diferidas usando varios métodos conocidos para alguien de experiencia en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Sección G. Típicamente, en las co-formulaciones proporcionadas en la presente, se proporciona cloruro de sodio en una cantidad que es o está alrededor de 0.05 M hasta 0.3 M, por ejemplo, en o alrededor de 0.05M, 0.06 M, 0.07 M, 0.08 M, 0.09 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M o más. Típicamente, la cantidad de sal está entre 0.05 M hasta 0.25 M, por ejemplo 0.15 M.

d. Estabilizador de aminoácidos

La co-formulación proporcionada en la presente contiene un estabilizador de aminoácidos, que contribuye a la estabilidad de la preparación. El estabilizador pueden ser los aminoácidos básicos y no polares. Los aminoácidos básicos y no polares ejemplares incluyen, pero no se limitan a, alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina. Por ejemplo, el estabilizador de aminoácido es glicina o prolina, típicamente glicina. El estabilizador puede ser un aminoácido sencillo o puede ser una combinación de 2 o más de tales aminoácidos. El estabilizador de aminoácidos puede ser aminoácidos naturales, análogos de aminoácido, aminoácidos modificados o equivalentes de aminoácido. Generalmente, el

aminoácido es un aminoácido L. Por ejemplo, cuando prolina se usa como el estabilizador, es generalmente L-prolina. También es posible usar equivalentes de aminoácido, por ejemplo, análogos de prolina.

5 Generalmente, se agrega una cantidad de uno o más aminoácidos efectivos para mantener la globulina inmunitaria en forma monomérica a la solución. La concentración del estabilizador de aminoácido, por ejemplo glicina, incluida en los intervalos de co-formulación líquida desde 0.1 M hasta 1 M de aminoácido, típicamente 0.1 M hasta 0.75 M, generalmente 0.2M hasta 0.5M, por ejemplo, al menos en o alrededor de 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.75 M o más. El aminoácido, por ejemplo glicina, puede usarse en una forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La pureza del aminoácido, por ejemplo glicina, debe ser al menos 98%, al menos 99%, o al menos 99.5% o más.

e. Otros agentes

20 Opcionalmente, las co-formulaciones pueden incluir portadores tal como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra una hialuronidasa o IG. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, generalmente en forma purificada o forma parcialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para administración apropiada

000152

para el paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, que incluyen aquellos de petróleo, animal, origen vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de frijol 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.

10 Por ejemplo, los portadores farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones amortiguadoras, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsificantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras
15 sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección Ringers, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y Ringers lactato. Los
20 vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de ajonjolí y aceite de cacahuate. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas pueden agregarse a preparaciones parenterales empacadas en recipientes de dosis múltiple, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico de metilo y propilo, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes

000153

isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Las soluciones amortiguadoras incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaina. Los agentes de suspensión y dispersión
5 incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsificantes incluyen Polisorbato 80 (TWEENS 80). Un agente secuestrante o quelante de iones de metal incluye EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol
10 y propilenglicol para vehículos miscible al agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

Las composiciones pueden contener junto con un ingrediente activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato
15 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 acaciagelatina de goma, glucosa, melazas, polivinilpirrolidona, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y
20 otros aglutinantes conocidos para aquellos de experiencia en la técnica.

Por ejemplo, una proteína excipiente puede agregarse a la co-formulación que puede ser cualquiera de un número de proteínas o péptidos farmacéuticamente aceptables. Generalmente, la proteína excipiente se selecciona por su capacidad para administrarse a un sujeto mamífero sin provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, albúmina de suero humana es bien adecuada para uso en formulaciones farmacéuticas. Otros

000154

excipientes de proteína farmacéuticos conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche descremada
5 seca, glicerol, propileno, glicol, agua, y etanol. El excipiente se incluye en la formulación en una concentración suficiente para prevenir adsorción de la proteína para el recipiente o vial de mantenimiento. La concentración del excipiente variará de acuerdo a la naturaleza del excipiente y la concentración de la proteína
10 en la co-formulación.

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,
15 acetato de sodio de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros tales agentes.

2. Formas de Dosificación

Las co-formulaciones proporcionadas en la presente pueden
20 formularse como formas de dosificación sencilla o múltiple. Por ejemplo, ya que la co-formulación proporcionada en la presente es estable durante periodos de tiempo prolongados, la co-formulación puede proporcionarse en forma de dosificación múltiple para administración sobre un intervalo de días, semanas, meses o años. De esta manera, la co-formulación líquida puede prepararse como formas de dosificación unitaria. La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad efectiva para producir el efecto

farmacológico deseado. Por ejemplo, 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. La dosis exacta depende de la edad, peso y afección del paciente o animal como se conocen en la técnica.

Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas empacadas en un recipiente sencillo para administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es una múltiple de dosis unitarias que no se segregan en empaquetado.

Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se empacan en una ampolleta, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida 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 deben estar estériles, como se conoce y practica en la técnica. Cuando se proporciona como una preparación de dosis múltiple, la formulación puede contener un agente bacteriostático.

3. Administración

Las composiciones co-formuladas proporcionadas en la presente típicamente se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por ruta subcutánea. Debido a la biodisponibilidad incrementada de IG en co-formulaciones con hialuronidasa, las

globulinas inmunitarias pueden administrarse subcutáneamente en dosificaciones y frecuencias para las cuales las preparaciones intravenosas actuales (IVIG) se preparan y administran. Las ventajas sobre formulaciones subcutáneas actuales de IG es que

5 hialuronidasa/IG co-formulado puede resultar en regímenes de dosificación más favorables, por ejemplo, dosificación menos frecuencia. por dosificación inferior o menos frecuente, pueden reducirse los efectos colaterales asociados con toxicidad. Generalmente, se mejora la farmacocinética y/o farmacodinámica de

10 terapia IG subcutánea. Además, las administraciones subcutáneas de IG también tienen ventajas sobre infusiones intravenosas actuales. Por ejemplo, la infusión subcutánea permite la infusión por el paciente o familia a diferencia de una enfermera experimentada; la infusión puede alcanzarse en tasas superiores

15 de manera que IG se infunde en 1-3 horas comparado con 5-10 horas para terapias IVIG convencionales; no existe requerimiento para venas funcionales; no existen efectos colaterales relacionados con la infusión tal como trombosis, dolor de cabeza, tromboflebitis, y nausea y menos probabilidad de eventos

20 adversos; y la infusión puede realizarse en el hogar o cualquier lugar.

La administración subcutánea también se desea para asegurar que las hialuronidasas se administran de modo que alcanzan el intersticio de piel o tejidos, por ello degrada el espacio intersticial para suministro posterior de inmunoglobulina. De esta manera, la administración directa bajo la piel, tal como por métodos de administración subcutánea, se contempla.

La administración puede ser local, tópica o sistémica

000157

dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a un área que necesita de tratamiento puede alcanzarse por, por ejemplo, pero no se limita a, infusión local, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunto con un apósito de herida después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Generalmente, la administración local se logra por inyección, tal como de una jeringa u otro artículo de fabricación que contiene un dispositivo de inyección tal como una aguja. En otro ejemplo, la administración local puede lograrse por infusión, que puede facilitarse por el uso de una bomba u otro dispositivo similar.

Otros modos de administración también se contemplan. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. La ruta más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tal como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la severidad de la enfermedad, la composición particular que se usa. Otras rutas de administración, tal como cualquier ruta conocida para aquellos de experiencia en la técnica, incluyen pero no se limitan a administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, intralesional, inyección intraperitoneal, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual), y transdérmica o cualquier ruta. Las formulaciones adecuadas para tales rutas se conocen para alguien de experiencia en la técnica.

Las composiciones también pueden administrarse con otros agentes biológicamente activos, ya sea secuencialmente,

intermitentemente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y liberación controlada del dispositivo, tal como por medio de una bomba.

5 La administración subcutánea, generalmente caracterizada por inyección o infusión, se contempla en la presente. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o
10 como emulsiones. Generalmente, las co-formulaciones proporcionadas en la presente se preparan como líquidos. Los inyectables son diseñados para administración local y sistémica. Para propósitos en la presente, la administración local se desea para administración directa al intersticio afectado. Las
15 preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tal como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes del uso, que incluyen comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección,
20 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 administran intravenosamente, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución amortiguadora salina de fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tal como glucosa, polietilenglicol, y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los métodos de administración pueden emplearse para

000159

disminuir la exposición de compuestos seleccionados para procesos degradantes, tal como degradación proteolítica e intervención inmunológica por medio de respuestas antigénicas e inmunogénicas.

Los ejemplos de tales métodos incluyen administración local en el

5 sitio de tratamiento. La PEGilación de terapéuticos se ha reportado para incrementar la resistencia a proteólisis, vida

media de plasma incrementada, y disminuir la antigenicidad e

inmunogenicidad. Los ejemplos de metodologías de PEGilación son

conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Lu and Felix, Int. J.

10 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

15 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 del gen (ver, por

ejemplo, Cheng et al. (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51).

20 Donde se administran volúmenes grandes, la administración es

típicamente por infusión. Los sujetos pueden dosificarse en tasas

de infusión en o alrededor de 0.5 ml/kg/PC/h hasta 5 ml/kg/PC/h,

por ejemplo en o alrededor de 0.5 ml/kg/PC/h, 1 ml/kg/PC/h, 2

ml/kg/PC/h, 3 ml/kg/PC/h, 4 ml/kg/PC/h, o 5 ml/kg/PC/h. La tasa

de infusión puede determinarse empíricamente, y típicamente es

una función de la tolerabilidad del sujeto. Si ocurre una

reacción adversa durante la infusión, la tasa de infusión puede

disminuirse a la tasa inmediatamente inferior que en la que

ocurrió el evento adverso. Si el evento adverso se resuelve en respuesta a la reducción en tasa, la tasa de infusión puede incrementarse lentamente a criterio del médico. La infusión subcutánea de co-formulaciones IG puede facilitarse por gravedad, 5 infusión de bomba o inyección de una dosis deseada, por ejemplo, una dosis de 20-30 gramos completa. Generalmente, para infusiones pueden emplearse bombas de infusión intravenosas. Las co-formulaciones de IG/hialuronidasa pueden infundirse a tasas en o alrededor de 5 ml/h, 10 ml/h, 30 ml/h, 60 ml/h, 120 ml/h, 240 10 ml/h o 300 ml/h. Las tasas de infusión pueden incrementarse durante el curso del tratamiento siempre y cuando la infusión sea tolerada por el paciente. Generalmente, el tiempo de administración de infusión está en o alrededor de 0.5 h, 1 h, 1.5h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 4 h o más. Debido a la alta tasa de 15 infusión alcanzada por administración subcutánea de IG co-formulacon con hialuronidasa, el tiempo de infusión es significativamente menor que para terapias IVIG convencionales. Donde el tiempo de infusión excede el límite deseado, un segundo sitio de infusión puede iniciarse en la discreción del sujeto y 20 médico. El segundo sitio típicamente se inicia al menos 10 cm del sitio inicial.

Las técnicas para infusión se conocen para alguien de experiencia en la técnica, y están dentro de la experiencia de un médico que trata. Generalmente, la dosis apropiada de co-formulación IG/hialuronidasa puede agruparse en una bolsa IV estándar. Por ejemplo, un conjunto de infusión no ventilado puede usarse ya que tiene un puerto Y cerca de su terminal. Una aguja de infusión subcutánea de calibre 24 puede insertarse en un sitio

000161

de las preferencias del sujeto, pero el abdomen y en segundo lugar los muslos se recomiendan debido al volumen de la solución a infundirse. La hialuronidasa e IG pueden proporcionarse en el mismo aparato de puerto Y. otros artículos de fabricación también
5 pueden usarse en la presente para propósitos de infusión por gravedad o una bomba, e incluyen, pero no se limitan a tubos, botellas, jeringas u otros recipientes.

En el evento que una infusión no se tolera (por ejemplo, provoca reacciones locales moderadas a severas), un segundo sitio
10 de infusión puede iniciarse de modo que el sujeto recibe la dosificación completa.

Además, se entiende que las co-formulaciones estables proporcionadas en la presente son susceptibles a regímenes de dosificación que involucran una frecuencia periódica de
15 administración. Por ejemplo, la frecuencia de dosificación puede ser diaria sobre un intervalo de tiempo dado sobre días consecutivos o alternados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En otros ejemplos, el régimen de dosificación es semanalmente, por ejemplo, una vez cada semana, cada dos
20 semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas o más. De esta manera, una preparación de IG/hialuronidasa puede administrarse de una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas para administrarse en intervalos de tiempo. Las preparaciones de IG/hialuronidasa seleccionadas pueden administrarse en una o más dosis sobre el curso de un tiempo de tratamiento por ejemplo sobre varias horas, días, semanas, o meses. En algunos casos, es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa

y curso de la administración depende de la indicación y tolerabilidad del paciente.

También, se entiende que la dosificación precisa y duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se trata y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Es para indicarse que las concentraciones y valores de dosificaciones también pueden variar con la severidad de la afección a aliviarse. Es para entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el paso del 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 son sólo ejemplares y no se pretenden para limitar el alcance o uso de composiciones y combinaciones que los contiene. Las composiciones pueden administrarse cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. Generalmente, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Debe indicarse que el médico que atiende debe conocer cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para disminuir la dosificación debido a toxicidad, o médula ósea, hígado o riñón u otras disfunciones del tejido. En cambio, el médico que atiende también debe conocer cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos colaterales tóxicos).

000163

G. Métodos para Evaluar la Estabilidad, Actividad, Biodisponibilidad y Farmacocinética

La estabilidad y actividad de IG e hialuronidasa en las formulaciones pueden evaluarse usando varios ensayos *in vitro* e *in vivo* que se conocen para alguien de experiencia en la técnica. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteína están disponible en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado.

Los ensayos para evaluar el tamaño molecular (por ejemplo provocado por agregación, desnaturalización naturalización y/o fragmentación) del IG es una consideración importante para evaluar la estabilidad de la co-formulación. Además, la estabilidad de las formulaciones líquidas también puede evaluarse por cualquiera de los ensayos que miden la actividad biológica de IG e hialuronidasa en la formulación. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Además de evaluar la estabilidad de la co-formulación, tales ensayos pueden usarse, por ejemplo, para determinar dosificaciones apropiadas de globulina inmunitaria e hialuronidasa, y la frecuencia de dosificación, para tratamiento. Además, los ensayos conocidos para alguien de experiencia en la técnica también pueden realizarse para evaluar las propiedades farmacocinéticas de globulina inmunitaria subcutáneamente administrada, que incluyen biodisponibilidad, y tolerabilidad.

000164

1. Tamaño Molecular

El parámetro que indica la estabilidad principal es el tamaño molecular, y un cambio en tamaño puede ser el resultado de degradación por desnaturalización, agregación o fragmentación. La
5 agregación de IG es un problema común durante el almacenamiento de productos IG. Los agregados son problemáticos debido a que pueden combinarse con complemento en la sangre del paciente y producir una reacción de anti-complemento. La capacidad de IG para enlazar el complemento está enormemente incrementada como un
10 resultado de desnaturalización, en particular por agregación a especies de alto peso molecular. El mecanismo de enlace del complemento de estos agregados aparece para ser idéntico a aquel de los complejos de antígeno-anticuerpo. Marcus, D. M., (1960) J. Immunol. 84:273-284. En el caso de IgG, se conoce que el sitio de
15 enlace de complemento requiere dos moléculas muy juntas. Por lo tanto es posible que se requiera empaquetado crítico de las moléculas, en vez de cualquier cambio conformacional necesario.

Los métodos para monitorear la estabilidad de IG están disponibles en la técnica, que incluyen aquellos métodos
20 descritos en la presente y en los ejemplos descritos en la presente. Existen varios métodos disponibles para evaluar la estabilidad de formulaciones de proteína, que incluyen formulaciones de anticuerpo o inmunoglobulina, basadas en las estructuras físicas y químicas de las proteínas así como en sus actividades biológicas. Por ejemplo, para estudio de agregación, fragmentación y desnaturalización de proteínas, los métodos tal como absorción de transferencia de carga, análisis térmico, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular, RMN,

000165

electroforesis de gel capilar reducida (rCGE), y cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño (HPSEC), están disponibles. Ver, por ejemplo, Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(supp):S4-S26. La rCGE, y HPSEC son los métodos más sencillos y más comunes para evaluar el tamaño molecular debido a la formación de agregados de proteína, degradación de proteína y fragmentación de proteína. Además, la actividad anticomplemento (ACA) puede determinarse directamente.

Por ejemplo, la estabilidad de las formulaciones líquidas puede evaluarse por HPSEC o rCGE, donde el porcentaje de área de los picos representa la proteína no degradada. En un ejemplo, la proteína se inyecta en una columna TosoH Biosep TSK G3000 SW 600 x 7.5 mm. La proteína se eluye. La proteína eluída se detecta usando absorbancia UV en 280 nm. Un estándar de referencia se corre en el ensayo como un control, y los resultados se reportan como el porcentaje de área del pico de monómero del producto comparado con todos los otros picos que excluyen el pico de volumen incluido. Los picos eluidos antes que el pico del monómero se registran como agregado de porcentaje.

La titulación ACA también puede determinarse como se describe en la Farmacopea Europea (Farmacopea Europea, 1997, 2a ed. Parte II. Maisonneuve, S.A., Saint Ruffine, Francia). Generalmente, la titulación ACA es un indicador de especificación para administración intravenosa (IV) y no es relevante para administración subcutánea de las co-formulaciones. De esta manera, para propósitos en la presente, la titulación ACA no es generalmente un indicador determinativo para co-formulaciones que se formulan para administración subcutánea.

000166

Generalmente, el ensayo ACA mide la cantidad del complemento que se enlaza por la mezcla de cantidades estandarizadas de complemento y proteína (ver por ejemplo, Palmer, D. F. and Whaley, S. D., Complement Fixation Test, in Manual of Clinical Laboratory Immunology (Ed. N. R. Rose, et al., American Society for Microbiology, Washington, D. C, 1986) pp. 57-66.; Mayer, M. M., Quantitative C' Fixation Analysis, Complement and Complement Fixation, in Experimental Immunochemistry (Ed. E. A. Kabat y M. M. Meyer, Thomas, Springfield, III., 1961), pp. 214-216, 227-228.) Brevemente, los glóbulos rojos que se han sensibilizado por preincubación con anticuerpos de glóbulos rojos se agregan a la mezcla de complemento/proteína. En presencia del complemento libre (ya no está enlazado por la proteína) estas células sensibilizadas se lisarán, liberando la hemoglobina que puede cuantificarse como una medición del grado de lisis. En paralelo, los glóbulos rojos sensibilizados también se agregan a una mezcla de control-complemento de solución amortiguadora, cuyo grado de lisis se define como 100%. La diferencia entre la cantidad actual de complemento necesario para dar lisis al 100% y la cantidad de complemento restante no enlazada en presencia de proteína iguala la cantidad de complemento actualmente enlazado por la proteína, o actividad anticomplemento. Una unidad de actividad ACA (una unidad CH₅₀) es la cantidad de proteína capaz de activar 50% del complemento en un complemento ópticamente titulado y sistema de glóbulos rojos/hemolisina. Generalmente, una titulación ACA aceptable es menor que 50% de unidades CH₅₀ consumidas por mg de proteína.

En otro ejemplo, la distribución de tamaño molecular, por

000167

ejemplo debido a formación de agregado, durante el almacenamiento de una co-formulación líquida puede determinarse fácilmente al medir el cambio en proteína soluble en solución con el paso del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en solución puede
5 cuantificarse por un número de ensayos analíticos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, HPLC de fase inversa (RP) y espectroscopia de absorción UV. La determinación de tanto agregados solubles como insolubles durante el almacenamiento en formulaciones líquidas puede lograrse, por ejemplo, usando ultracentrifugación
10 analítica para distinguir entre tal porción del polipéptido soluble que se presenta como agregados solubles y tal porción que se presenta en el no agregado, forma molecular biológicamente activa.

En un ejemplo adicional, la estabilidad de co-formulaciones
15 puede evaluarse al calentar el producto terminado a una temperatura de 57°C y mantenido a tal temperatura durante cuatro horas mientras se examina el producto para precipitados visuales. (Ver por ejemplo, Code of Federal Regulations 21, Food and Drugs, 640. 101a (revisada en abril de 1978)). En una modificación del
20 método (ver por ejemplo, Fernandes and Lundblad, Vox Sang 39:101-112 (1980)), aproximadamente 2 mililitros del producto de prueba se calienta a 57°C durante cuatro horas y luego se evalúa el cambio de porcentaje en grados de opalescencia como se mide al registrar la transmitancia en 580 nm con un espectrofotómetro de laboratorio (ver también Patente de E.U.A. No. 4,597,966).

SDS-PAGE también puede usarse para evaluar la agregación y/o fragmentación. La densidad o la radioactividad de cada banda teñida o etiquetada con radioisótopo puede medirse y puede

000168

obtenerse el % de densidad o % de radioactividad de la banda que representa la proteína no degradada.

Generalmente, las co-formulaciones muestran niveles bajos hasta no detectables de agregación como se mide por cualquiera de los ensayos de arriba, por ejemplo HPSEC o rCGE. Por ejemplo, la agregación es, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1%, y generalmente no más de 0.5% de agregado por proteína en peso, y niveles bajos hasta no detectables de fragmentación, esto es, 80% o superior, 85% o superior, 90% o superior, 95% o superior, 98% o superior, o 99% o superior, o 99.5% o superior del área de pico total en los picos que representan anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, típicamente, una agregación aceptable incluye $\geq 90\%$ de monómeros y oligo-/dímeros; $\leq 5\%$ de agregados, y $\leq 5\%$ de fragmentos.

2. Actividad biológica

a. Globulina inmunitaria

La capacidad de globulina inmunitaria para actuar como un agente terapéutico puede evaluarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, ensayos *in vitro* pueden realizarse para evaluar la capacidad de globulina inmunitaria para neutralizar infectividad vírica o bacteriana (Hiemstra et al., (1994) J Lab Clin Med 123:241-6). Otros ensayos *in vitro* pueden utilizarse para evaluar otras actividades biológicas de globulina inmunitaria. Por ejemplo, la capacidad de preparaciones de globulina inmunitaria para interactuar con y modular productos de activación de complemento, anticuerpo idiotípico de enlace, receptores Fc de

000169

enlace en macrófagos, y suprimir varios mediadores inflamatorios que incluyen citoquinas, quimiocinas, y metaloproteinasas, puede evaluarse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, ELISA, Western blot, Northern blot, y citometría de flujo para evaluar expresión marcadora. Por ejemplo, el efecto de globulina inmunitaria en la expresión de receptores de quimiocina en células mononucleares de sangre periférica puede evaluarse usando citometría de flujo (Trebst et al, (2006) Eur J Neurology 13(12):1359-63). En otro ejemplo, el efecto de globulina inmunitaria en expresión de metaloproteinasa en macrófagos puede evaluarse usando análisis Northern blot (Shapiro et al, (2002) Cancer 95:2032-2037).

Los estudios *in vivo* usando modelos de animal también pueden realizarse para evaluar la actividad terapéutica de globulina inmunitaria. La globulina inmunitaria puede administrarse a modelos de animal infectados con uno o más microorganismos y puede evaluarse el efecto en el avance de la infección, tal como al medir el número de microorganismos o medir el peso como un marcador de morbilidad. El efecto terapéutico de globulina inmunitaria también puede evaluarse usando modelos de animal de las enfermedades y afecciones para la cual la terapia se considera usando globulina inmunitaria. Tales modelos de animal se conocen en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, modelos de animal pequeños para agamaglobulinemia ligada a X (XLA), SCID, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Guillain-Barré, ITP, polimiositis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltmann (Czitrom et al. (1985) J. Immunol 134:2276-2280).

Ellmeier et al, (2000) J Exp Med. 192: 1611-1624, Ohno (2006) Drug Discovery Today:Disease Models 3:83-89, Oyaizu et al. (1988) J Exp Med 2017-2022, Hansen et al, (2002) Blood 100:2087-2093, Strongagua et al, (1984) Arthritis Rheum. 27:433-42, Kim et al (1998) Annals NY Acad Sci 841:670-676, Christadoss et al (2000) Clin. Immunol 94:75-87, Sommer et al, (2005) Lancet 365:1406-1411 y Patente de E.U.A. No.7,309,810)

b. Hialuronidasa

La actividad de hialuronidasa puede evaluarse usando los métodos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, la actividad se mide usando un ensayo de microturbidez. Esto es basado en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con albúmina de suero. La actividad se mide al incubar la hialuronidasa con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo 10 minutos) y luego precipitar el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero ácida. La turbidez de la muestra resultante se mide en 640 nm después de un periodo de desarrollo adicional. La disminución en turbidez que resulta de la actividad de hialuronidasa en el sustrato de hialuronato de sodio es una medición de actividad enzimática de hialuronidasa. En otro ejemplo, la actividad de hialuronidasa se mide usando un ensayo de microtitulación en el cual se mide el ácido hialurónico biotinilado residual después de incubación con hialuronidasa (ver por ejemplo Frost and Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, Publicación de Patente de E.U.A. No. 20050260186). Los grupos carboxilo libres en los residuos de ácido glucurónico de ácido

000171

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. Otros ensayos para medir la actividad de hialuronidasa también son conocidos en la técnica y pueden usarse en los métodos en la presente (ver por ejemplo Delpech et al, (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al, (2003) Anal. Biochem. 322:257-263).

La capacidad de hialuronidasa para actuar como un agente de extensión o difusión también puede evaluarse. Por ejemplo, el pigmento de azul de tripano puede inyectarse subcutáneamente con o sin hialuronidasa en la piel lateral en cada lado de ratones sin pelo. El área de pigmento luego se mide, tal como con un microcalibrador, para determinar la capacidad de hialuronidasa para actuar como un agente de extensión (Patente de E.U.A. No. 20060104968).

3. Farmacocinética y tolerabilidad

Pueden realizarse estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad usando modelos de animal o pueden realizarse durante estudios clínicos con pacientes. Los modelos de animal incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, conejillos de indias y modelos primate no humanos, tales como monos cynomolgus o macacos rhesus. En algunos casos, los estudios farmacocinéticos y de tolerabilidad se realizan usando animales

saludables. En otros ejemplos, los estudios se realizan usando modelos de animal de una enfermedad para la cual la terapia con globulina inmunitaria se considera, tal como modelos de animal de cualquiera de las enfermedades y afecciones descritas a
5 continuación.

La farmacocinética de globulina inmunitaria administrada subcutáneamente puede evaluarse al medir tales parámetros como la concentración de globulina inmunitaria de plasma máxima (pico) (C_{max}), el tiempo pico (esto es cuando la concentración de
10 globulina inmunitaria de plasma máxima ocurre; T_{max}), la concentración de globulina inmunitaria de plasma mínima (esto es la concentración de plasma mínima entre dosis de globulina inmunitaria; C_{min}), la vida media de eliminación ($T_{1/2}$) y área bajo la curva (esto es el área bajo la curva generada por tiempo de
15 determinación contra plasma concentración de globulina inmunitaria; AUC), después de la administración. La biodisponibilidad absoluta de globulina inmunitaria administrada subcutáneamente se determina al comparar el área bajo la curva de globulina inmunitaria después del suministro subcutáneo (AUC_{sc})
20 con el AUC de globulina inmunitaria después de suministro intravenoso (AUC_{iv}). La biodisponibilidad absoluta (F), puede calcularse usando la fórmula: $F = ([AUC]_{sc} \times dosis_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times dosis_{iv})$. La concentración de globulina inmunitaria en el plasma después de la administración subcutánea puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica adecuada para evaluar concentraciones de globulina inmunitaria en muestras de sangre. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ELISA y nefelometría.

000173

Un intervalo de dosis y frecuencia de dosificación diferente de dosificación pueden administrarse en los estudios farmacocinéticos para evaluar el efecto de incrementar o disminuir las concentraciones de globulina inmunitaria e/o hialuronidasa en la dosis. Las propiedades farmacocinéticas de globulina inmunitaria administrada subcutáneamente, tales como biodisponibilidad, también pueden evaluarse con o sin co-administración de hialuronidasa. Por ejemplo, perros, tal como sabuesos, pueden administrarse globulina inmunitaria subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, o sola. Las dosis intravenosas de globulina inmunitaria también se dan a otro grupo de sabuesos. Las muestras de sangre luego pueden tomarse en varios puntos de y la cantidad de globulina inmunitaria en el plasma determinarse, tal como por nefelometría. El AUC luego puede medirse y puede determinarse la biodisponibilidad de globulina inmunitaria administrada subcutáneamente administrada con o sin hialuronidasa. Tales estudios pueden realizarse para evaluar el efecto de co-administración con hialuronidasa en propiedades farmacocinéticos, tal como biodisponibilidad, de globulina inmunitaria administrada subcutáneamente.

Los estudios para evaluar seguridad y tolerabilidad también son conocidos en la técnica y pueden usarse en la presente. Después de la administración subcutánea de globulina inmunitaria, con o sin co-administración de hialuronidasa, puede monitorearse el desarrollo de cualquiera de las reacciones adversas. Las reacciones adversas pueden incluir, pero no se limitan a, reacciones del sitio de inyección, tal como edema o hinchazón, dolor de cabeza, fiebre, fatiga, resfriado, ruborizado, mareo,

000174

urticaria, resuello o opresión en el pecho, náusea, vómito, escalofríos, dolor de espalda, dolor de pecho, calambres del musculo, ataques o convulsiones, cambios en la presión sanguínea y respuestas anafilácticas o hipersensibilidad severa.

5 Típicamente, un intervalo de dosis y frecuencias de dosificación diferentes se administran en los estudios de seguridad y tolerabilidad para evaluar el efecto de incrementar o disminuir las concentraciones de globulina inmunitaria e/o hialuronidasa en la dosis.

10

H. MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y USOS TERAPÉUTICOS

Las co-formulaciones de IG/hialuronidasa descritas en la presente pueden usarse para tratamiento de cualquier afección para la cual se emplea globulina inmunitaria. La globulina
15 inmunitaria (IG) puede administrarse subcutáneamente en co-formulaciones con hialuronidasa, para tratar cualquier afección que es enmendable para tratamiento con globulina inmunitaria. Esta sección proporciona usos terapéuticos ejemplares de co-formulaciones de IG/hialuronidasa. Se entiende que las co-
20 formulaciones de IG/hialuronidasa proporcionadas en la presente pueden usarse en métodos, procesos u usos para tratar cualquiera de las enfermedades y afecciones descritas a continuación y otras enfermedades y afecciones conocidas para alguien de experiencia en la técnica que son tratables por IG. En particular, se contempla la administración subcutánea de las co-formulaciones. Las dosificaciones de IG administrada son las mismas o similares a la dosificación administrada intravenosamente y conocidas para alguien de experiencia en la técnica. El régimen de dosificación

000175

y frecuencia puede variar de regímenes intravenosos como se describe en cualquier lugar en la presente. Los usos terapéuticos descritos a continuación son ejemplares y no limitan las aplicaciones de los métodos descritos en la presente.

5 Por ejemplo, las co-formulaciones proporcionadas en la presente pueden usarse para tratar deficiencias inmunitarias tal como deficiencias inmunitarias primarias, tal como agammaglobulinemia ligada a X, hipogammaglobulinemia, y afecciones de inmunidad comprometida adquiridas (deficiencias
10 inmunitarias secundarias), tal como aquellas que caracterizan niveles de anticuerpo bajos; enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y afecciones agudas. Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, terapia de reemplazo de inmunoglobulina y terapia de inmunomodulación para varias
15 enfermedades y afecciones inmunológicas, hematológicas, neurológicas, inflamatorias, dermatológicas e/o infecciosas. En algunos ejemplos, la globulina inmunitaria se administra para aumentar la respuesta inmunitaria en pacientes saludables, tal como después de la exposición posible a enfermedad infecciosa
20 (por ejemplo lesión por pinchazo de aguja accidental). Las co-formulaciones IG proporcionadas en la presente también pueden usarse para tratar esclerosis múltiple (especialmente esclerosis múltiple de recaída-remitente RRMS), enfermedad de Alzheimer, y mal de Parkinson. Está dentro de la experiencia de un médico que trata identificar tales enfermedades o afecciones.

Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse en combinación con otros agentes usados en el tratamiento de estas enfermedades y afecciones. Por ejemplo,

otros agentes que pueden administrarse incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, quimioterapéuticos, anti-inflamatorios esteroideos, anti-inflamatorios no esteroideos, y otros agentes inmunomoduladores tal como citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

Si es necesario, una dosificación y duración particular y protocolo de tratamiento pueden determinarse empíricamente o extrapolarse. Por ejemplo, las dosis ejemplares de globulina inmunitaria administrada intravenosamente pueden usarse como un punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación pueden determinarse basados en una variedad de factores, tal como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármaco, la severidad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del método que trata. Las dosificaciones ejemplares de globulina inmunitaria e hialuronidasa se proporcionan en cualquier lugar en la presente. Se entiende que la cantidad a administrar será una función de la indicación tratada, y posiblemente los efectos colaterales que tolerará. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente usando modelos reconocidos para cada trastorno.

Durante la mejora de una afección del paciente, una dosis de mantenimiento de globulina inmunitaria puede administrarse subcutáneamente en combinación con hialuronidasa, si es necesario, y la dosificación, puede modificarse la forma de dosificación, o frecuencias de administración, o una combinación de los mismos. En algunos casos, un sujeto puede requerir

tratamiento intermitente en una base de larga duración durante cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

1. Deficiencia Inmunitaria Primaria y Secundaria

5 a. Deficiencia Inmunitaria Primaria

Más de 80 enfermedades de deficiencia inmunitaria primaria se reconocen por la Organización Mundial de la Salud y ocurren en alrededor de 1 de cada 10,000 individuos. Estas enfermedades se caracterizan por un defecto intrínseco en el sistema inmunitario en el cual, en algunos casos, el cuerpo es incapaz de producir cualquiera o suficientes anticuerpos contra la infección. En otros casos, las defensas celulares para luchar contra la infección fallan para trabajar apropiadamente. La globulina inmunitaria puede usarse para tratar deficiencia inmunitaria primaria con deficiencia de anticuerpos. De esta manera, la globulina inmunitaria puede administrarse como terapia de reemplazo de inmunoglobulina para pacientes que se presentan con tales enfermedades.

Típicamente, las deficiencias inmunitarias primarias son trastornos heredados. Los ejemplos de deficiencias inmunitarias primarias incluyen, pero no se limitan a, deficiencia inmunitaria variable común (CVID), deficiencia IgA selectiva, deficiencia de subclase IgG, agammaglobulinemia ligada a X (XLA), deficiencia inmunitaria combinada severa (SCID), trastornos de complemento, ataxia telangiectasia, hiper IgM, y síndrome de Wiskott-Aldridge. Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a pacientes con enfermedades de deficiencia inmunitaria primaria con deficiencia de

000178

anticuerpos en dosis similares a las dosis usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria. Las dosis ejemplares incluyen, por ejemplo, entre 100 mg/kg de PC y 800 mg/kg de PC de globulina inmunitaria, en intervalos de cuatro 5 semanas. La dosis puede incrementarse o disminuirse, al igual que la frecuencia de las dosis, dependiendo de la respuesta clínica.

b. Deficiencia Inmunitaria Secundaria

La deficiencia inmunitaria, secundaria, o adquirida no es el 10 resultado de anormalidades genéticas heredadas, sino más bien ocurre en individuos en los cuales el sistema inmunitario se compromete por factores fuera del sistema inmunitario. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, trauma, virus, quimioterapia, toxinas, y polución. El síndrome de 15 inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un ejemplo de un trastorno de deficiencia inmunitaria secundaria provocado por un virus, el virus de inmunodeficiencia humano (VIH), en el cual una eliminación de linfocitos T hace al cuerpo incapaz de luchar contra la infección.

20 Otro ejemplo, la hipogammaglobulinemia, se provoca por una carencia de linfocitos B, se caracteriza por niveles bajos de anticuerpos en la sangre, y puede ocurrir en pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), linfoma no de Hodgkin (NHL) y otras malignidades relevantes como un resultado de tanto disfunción inmunitaria relacionada con leucemia e inmunosupresión relacionada con terapia. Los pacientes con hipogammaglobulinemia adquirida secundaria para tales malignidades hematológicas, y aquellos pacientes que reciben

transplate de células madre post- hematopoyéticas son susceptibles a infecciones bacterianas. La deficiencia en inmunidad humoral es en gran parte responsable para el riesgo incrementado de movilidad y mortalidad relacionada con infección en estos pacientes, especialmente al encapsular microorganismos. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Staphylococcus aureus*, así como las especies *Legionella* y *Nocardia*, son patógenos bacterianos frecuentes que provocan neumonía en pacientes con CLL. Las infecciones oportunistas tal como *Pneumocystis carinii*, hongos, virus, y micobacterias también se han observado. El número y severidad de infecciones en estos pacientes pueden reducirse significativamente por administración de globulina inmunitaria (Griffiths et al. (1989) Blood 73:366-368; Chapel et al. (1994) Lancet 343:1059-1063).

Por lo tanto, las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente en tales pacientes para prevenir infecciones recurrentes. Las dosificaciones ejemplares incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria a pacientes con hipogamaglobulinemia adquirida secundaria para malignidades hematológicas. Por ejemplo, laas co-formulaciones que contienen alrededor de 400 mg/kg de globulina inmunitaria PC pueden administrarse subcutáneamente cada 3 hasta 4 semanas. En un ejemplo adicional, una dosis adicional de 400 mg/kg de PC puede administrarse en el primer mes de terapia en casos donde el IgG de suero del paciente es menor que 4 g/L. La cantidad de globulina inmunitaria administrada, y las frecuencias de las dosis, pueden incrementarse o disminuirse como sea apropiado

2. Enfermedades Inflamatorias y Autoinmunitarias

a. Enfermedad de Kawasaki

La enfermedad de Kawasaki es una enfermedad de sistema múltiple, febril, aguda de niños y lactantes, a menudo involucra las arterias coronarias. También se conoce como síndrome de ganglio linfático, enfermedad de ganglio mucocutáneo, poliarteritis infantil y síndrome de Kawasaki. La enfermedad de Kawasaki es una vasculitis auto-limitada, escasamente entendida, que afecta muchos órganos, que incluyen la piel, membranas mucosas, ganglios linfáticos, paredes de los vasos sanguíneos, y el corazón. Las aneurismas de arteria coronaria pueden ocurrir de la segunda semana de enfermedad durante la etapa convaleciente. Aunque la causa de la afección se desconoce, existe evidencia de que la vasculitis característica resulta de una reacción inmunitaria caracterizada por activación de células T de macrófagos a un antígeno desconocido, secreción de citoquinas, hiperactividad de célula B policlonal, y la formación de autoanticuerpos para células endoteliales y células del musculo liso. En individuos genéticamente susceptibles, uno o más agentes infecciosos comunes no caracterizados, posiblemente con actividad de súper-antígeno, puede disparar la enfermedad.

La globulina inmunitaria administrada al inicio de la enfermedad de Kawasaki puede prevenir la patología de arteria coronaria. La administración subcutánea de co-formulaciones de globulina/hialuronidasa inmunitarias a pacientes con inflamación en curso asociada con enfermedad de Kawasaki puede aliviar los síntomas. Las dosificaciones ejemplares incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria

000181

pacientes con enfermedad de Kawasaki. Por ejemplo, un paciente con enfermedad de Kawasaki puede administrarse alrededor de 1-2 g/kg paciente de peso corporal de globulina inmunitaria. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cuatro dosis de 400 mg/kg de PC durante cuatro días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg de globulina inmunitaria PC se administra como una dosis sencilla durante un periodo de 10 horas. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse como sea apropiado.

10

b. Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica

La polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, por sus siglas en inglés) es un trastorno neurológico caracterizado por debilidad progresiva y función sensorial afectada en las piernas y brazos. El trastorno, que es algunas veces llamado polineuropatía reincidente crónica, es provocado por daño a la capa de mielina de los nervios periféricos. Aunque puede ocurrir a cualquier edad y en ambos géneros, CIDP es más común en adultos jóvenes, y en hombres más que en mujeres. A menudo se presenta con síntomas que incluyen hormigueo o adormecimiento (comenzando en los dedos de los pies y manos), debilidad de los brazos y piernas, pérdida de reflejos del tendón profundo (areflexia), fatiga, y sensaciones anormales. CIDP está estrechamente relacionada con el síndrome Guillain-Barré y se considera la contraparte crónica de tal enfermedad aguda. No existe prueba de diagnóstico específica, pero los hallazgos de laboratorio y clínicos característicos ayudan a distinguir este trastorno de otros síndromes neuropáticos mediados inmunitarios.

000182

Los estudios indican que el tratamiento con globulina inmunitaria reduce los síntomas (van Schaik et al. (2002) Lancet Neurol. 1:497-498). De esta manera, las co-formulaciones de globulina/hialuronidasa inmunitarias pueden administrarse subcutáneamente a pacientes que se presentan con CIDP usando los métodos descritos en la presente. Las dosificaciones ejemplares incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria a pacientes con CIDP. En un ejemplo, un paciente con CIDP se le administra alrededor de 2 g/kg PC de globulina inmunitaria subcutáneamente, en combinación con hialuronidasa. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC durante cinco días consecutivos. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse como sea apropiado.

c. Síndrome Guillain-Barré

El síndrome Guillain-Barré es un trastorno autoinmunitario neurológico que involucra desmielinación inflamatoria de nervios periféricos. Los primeros síntomas incluyen grados variados de debilidad o sensaciones de hormigueo en las piernas, que pueden extenderse a los brazos y cuerpo superior. Estos síntomas pueden incrementar en intensidad hasta que los músculos no pueden usarse en absoluto y el paciente está casi totalmente paralizado, resultando en una afección que amenaza la vida. Aunque la recuperación es generalmente buena o completa en la mayoría de los pacientes, la discapacidad persistente se ha reportado en alrededor de 20% de todos los pacientes y muerte en 4 hasta 15% de los pacientes. El síndrome Guillain-Barré puede ocurrir unos

000183

pocos días o semanas después de los síntomas de una infección vírica respiratoria o gastrointestinal. En algunos casos, la cirugía o vacunas pueden disparar el síndrome. El trastorno puede desarrollarse durante el curso de horas o días, o puede tomar hasta 3 hasta 4 semanas. Una prueba de velocidad de conducción del nervio (NCV) puede dar las pistas al doctor para ayudar al diagnóstico. En algunos casos, una punción lumbar puede usarse en el diagnóstico, ya que el fluido cerebroespinal en pacientes con el síndrome Guillain-Barré típicamente contiene más proteína que los sujetos normales.

Aunque no se conoce cura para el síndrome Guillain-Barré, el tratamiento con globulina inmunitaria puede disminuir la severidad de la enfermedad y acelerar la recuperación. Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a paciente en una dosis apropiada de IG, tales como, por ejemplo, una dosis similar a la dosis usada para administrar globulina inmunitaria intravenosamente a pacientes con síndrome de Guillain-Barré. Por ejemplo, un paciente con síndrome Guillain-Barré puede administrarse alrededor de 2 g/kg PC de globulina inmunitaria, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esto puede administrarse, por ejemplo, en cinco dosis de 400 mg/kg de PC durante cinco días consecutivos. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse dependiendo de, por ejemplo, la severidad de la enfermedad y la respuesta clínica a la terapia, que puede fácilmente evaluarse por alguien de experiencia en la técnica.

000184

d. Púrpura Trombocitopénica Idiopática

La púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), también conocida como púrpura trombocitopénica inmunitaria primara y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, es una reducción en el conteo de plaquetas (trombocitopenia) que resulta de la sobrevivencia de plaquetas acortada debido a anticuerpos anti-plaqueta. Cuando los conteos de plaquetas son muy bajos (por ejemplo, $<30 \times 10^9/L$), ocurre la hemorragia en la piel (púrpura) y membranas mucosas. La producción de plaquetas de la médula ósea (megacariopoyesis) en pacientes con ITP es morfológicamente normal. En algunos casos, existe discapacidad adicional de la función de plaquetas relacionada con el anticuerpo enlazado a glicoproteínas en la superficie de plaquetas. ITP puede presentarse como formas crónicas y agudas. Aproximadamente 80% de adultos con ITP tienen la forma crónica de la enfermedad. La incidencia más alta de ITP crónica es en mujeres en edad de 15-50 años, aunque algunos reportes sugieren incidencia incrementada con la edad. La ITP es relativamente común en pacientes con VIH. Aunque la ITP puede encontrarse en cualquier etapa de la infección, su prevalencia incrementa como avanza la enfermedad por VIH.

Los estudios han demostrado que la globulina inmunitaria puede usarse para tratar pacientes con ITP (Godeau et al. (1993) Blood 82(5):1415-21; Godeau et al. (1999) Br. J. Haematol. 107(4): 716-9). Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a pacientes en una dosis de IG similar a la dosis usada para administrar globulina inmunitaria

000185

intravenosamente para tratar pacientes con ITP. Por ejemplo, un paciente con ITP puede administrarse alrededor de 1 hasta 2 g/kg PC de globulina inmunitaria, en combinación con hialuronidasa, subcutáneamente. Esta puede administrarse durante varios días, o puede administrarse en una dosis. En algunos ejemplos, se administra cinco dosis de 400 mg/kg de PC globulina inmunitaria en días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg PC se administra durante 1-2 días consecutivos, dependiendo del conteo de plaquetas y respuesta clínica. La cantidad de globulina inmunitaria administrada, y la frecuencia de las dosis, puede incrementarse o disminuirse dependiendo de, por ejemplo, el conteo de plaquetas y la respuesta clínica a la terapia, la cual puede fácilmente evaluarse por alguien de experiencia en la técnica.

e. Miopatías Inflamatorias

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades del músculo que involucran la inflamación y degeneración de los tejidos del musculo esquelético. Estos trastornos adquiridos todos presentes con debilidad del músculo importante y presencia de una respuesta inflamatoria dentro del músculo.

i. Dermatomiositis

La dermatomiositis (DM, por sus siglas en inglés) es la más fácilmente reconocida de las miopatías inflamatorias debido a su sarpullido distintivo, que ocurre como un sarpullido disparejo, oscuro, rojizo o lila en los párpados, mejillas, y puente de la nariz, y en la espalda o pecho superior, codos, rodillas y nudillos. En algunos pacientes, los nódulos calcificados o

000186

protuberancias duras se desarrollan bajo la piel. El sarpullido a menudo precede a la debilidad del músculo, que típicamente se desarrolla durante un periodo de semanas, pero puede desarrollarse durante meses o aún días. La dermatomiositis puede

5 ocurrir a cualquier edad de la infancia hasta la edad adulta, y es más común en mujeres que en hombres. Aproximadamente un tercio de los pacientes con DM reportan dificultad para tragar. Más de 50% de los niños con DM se quejan de dolor muscular y sensibilidad, aunque esto generalmente ocurre en menos de 25% de

10 adultos con DM.

ii. Polimiositis

La polimiositis (PM, por sus siglas en inglés) no tiene el sarpullido característico de dermatomiositis, y el comienzo de la debilidad muscular usualmente progresa más lento que DM. Muchos

15 pacientes con PM se presentan con dificultad para tragar. En algunos casos, los pacientes también tienen dificultad para respirar debido a la falla muscular. Hasta un tercio de pacientes PM tienen dolor muscular. La enfermedad afecta más mujeres que hombres, y rara vez afecta a personas menores de 20 años, aunque

20 los casos de polimiositis en la niñez e infantes se han reportado.

iii. Miositis del Cuerpo de Inclusión

La miositis del cuerpo de inclusión (IBM, por sus siglas en inglés) es muy similar a polimiositis. El comienzo de la debilidad muscular en IBM es usualmente muy gradual, tomando lugar durante meses o años. Esto difiere de PM en que tanto los músculos próximos y distales se afectan, aunque generalmente sólo

los músculos próximos se afectan en PM. Los hallazgos típicos incluyen debilidad de los flexores de la muñeca y flexores de los dedos. La atrofia de los antebrazos y el musculo de los cuádriceps es característico de la enfermedad, con grados
5 variados de debilidad en otros músculos. Aproximadamente la mitad de los pacientes afligidos con IBM tienen dificultada para tragar. Los síntomas de IBM usualmente comienzan después de los 50 años de edad, aunque ningún grupo de edad se excluye. IBM ocurre más frecuentemente en hombres que mujeres. Alrededor de
10 uno de diez casos de IBM puede ser hereditario.

Los estudios indican que la administración de globulina inmunitaria puede beneficiar a pacientes con estas miopatías inflamatorias. La globulina inmunitaria puede mejorar la fuerza del músculo, reducir la inflamación y reducir el progreso y
15 severidad de la enfermedad (Dalakas et al. (1993) N. Engl. J. Med. 329(27): 1993-2000; Dalakas et al. (2001) Neurology 56(3):323-7; Dalakas (2004) Pharmacol. Ther. 102(3): 177-93; Walter et al. (2000) J. Neurol. 247(1):22-8). Las co-
formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden
20 administrarse subcutáneamente a pacientes con DM, PM o IBM en una dosis de IG similar para la dosis usada para administrar globulina inmunitaria intravenosamente. Por ejemplo, 2 g/kg PC de globulina inmunitaria puede administrarse, típicamente durante varios días, tales como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en días consecutivos.

f. Síndrome Miasténico Lambert-Eaton

El síndrome miasténico Lambert-Eaton (LEMS) es un trastorno autoinmunitario raro de transmisión neuromuscular reconocida

000188

primero clínicamente en asociación con cáncer pulmonar, y posteriormente en casos en los cuales no se detectó neoplasma. Los pacientes con LEMS tienen un defecto de unión neuromuscular presináptico. La enfermedad se caracteriza clínicamente por debilidad muscular próxima, con aumento de fuerza después del ejercicio, signos oculomotores medios, reflejos del tendón profundos bajos y disfunción autonómica (boca seca, estreñimiento, falla eréctil).

La administración subcutánea de co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa para pacientes con LEMS puede aliviar los síntomas. Las dosificaciones ejemplares de IG en las co-formulaciones incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria para pacientes con LEMS. Por ejemplo, un paciente con LEMS puede administrarse 2 g/kg PC de globulina inmunitaria durante varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC de globulina inmunitaria pueden administrarse en cinco días consecutivos. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse como sea apropiado.

g. Neuropatía del Motor Multifocal

La neuropatía del motor multifocal (MMN, por sus siglas en inglés) con bloque de conducción es una neuropatía desmielinante mediada inmunitaria adquirida con debilidad progresiva lentamente, fasciculaciones y calambre, sin involucramiento sensorial importante. La duración de la enfermedad antes del diagnóstico en los intervalos desde varios meses hasta más de 15 años. La causa precisa de MMN se desconoce. Los estudios

histopatológicos y de electrodiagnóstico demuestran la presencia de tanto lesión desmielinante y axonal. Los nervios motores se afectan principalmente, aunque la desmielinación suave se ha demostrado en nervios sensoriales también. La eficacia del tratamiento inmunomodulador e inmunosupresivo soporta además la naturaleza inmunitaria de MMN. Las titulaciones de anticuerpos anti-GM1 se elevan en más de la mitad de los pacientes con MMN. Aunque el papel de los anticuerpos anti-GM1 en la enfermedad se desconoce, su presencia puede usarse como un marcador diagnóstico para MMN.

La administración subcutánea de co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa a pacientes con MMN puede aliviar los síntomas. Las dosificaciones ejemplares de IG en las co-formulaciones incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria para pacientes con MMN. Por ejemplo, un paciente con MMN puede administrarse 2 g/kg PC de globulina inmunitaria durante varias dosis. Por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC de globulina inmunitaria pueden administrarse en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg PC puede administrarse en 2 días consecutivos. A algunos pacientes se les puede dar terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, dosis de 400 mg/kg de PC hasta 2 g/kg PC, dado cada 2-6 semanas. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse como sea apropiado, tomando en cuenta la respuesta del paciente.

h. Miastenia Gravis

La miastenia gravis (MG, por sus siglas en inglés) es una

000190

enfermedad neuromuscular autoinmunitaria crónica caracterizada por grados variados de debilidad de los músculos esqueléticos del cuerpo. Esto se asocia con la presencia de anticuerpos para receptores de acetilcolina (AChR) o tirosina cinasa específica del músculo (MuSK) en la unión neuromuscular, aunque algunos pacientes son negativos a los anticuerpos. Las características clínicas de MG incluyen debilidad fluctuante y fatiga de músculos voluntarios, particularmente músculos del elevador de los párpados, extraoculares, bulbares, de las extremidades y respiratorios. Los pacientes usualmente se presentan con caída unilateral o bilateral del párpado (ptosis), visión doble (diplopia), dificultad para tragar (disfagia) y debilidad del músculo próximo. La debilidad de los músculos respiratorios puede resultar en insuficiencia respiratoria en casos severos, o en exacerbaciones severas agudas (crisis miasténica). La miastenia gravis ocurre en todos los grupos étnicos y ambos géneros. Afecta más comúnmente a mujeres adultas jóvenes menores de 40 y hombres más viejos de 60, pero puede ocurrir a cualquier edad. En algunos casos, la timentomía se realiza para reducir los síntomas.

La globulina inmunitaria puede usarse, por ejemplo, como terapia de mantenimiento para pacientes con MG moderada hasta severa, típicamente cuando otros tratamientos han sido ineficaces o provocados por efectos colaterales severos, y también pueden administrarse antes de la timentomía o durante una exacerbación aguda de la enfermedad (crisis miasténica). Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a pacientes con MG usando los métodos descritos en la presente. Las dosificaciones ejemplares de IG en las co-

formulaciones incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria a pacientes con MG. Por ejemplo, un paciente con MG puede administrarse dosis de 400 mg/kg de PC hasta 2 g/kg PC cada 4-6 semanas para terapia de mantenimiento. Antes de la timectomía o durante la crisis miasténica, 1-2 g/kg PC puede administrarse durante varias dosis, tales como, por ejemplo, cinco dosis de 400 mg/kg de PC en cinco días consecutivos. En otro ejemplo, 1 g/kg PC puede administrarse en 2 días consecutivos.

i. Síndrome Moersch-Woltmann

El síndrome Moersch-Woltmann, también conocido como síndrome de persona rígida (SPS, por sus siglas en inglés) o síndrome de hombre rígido, es un trastorno neurológico raro con características de una enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes se presentan con síntomas relacionados con rigidez muscular y espasmos episódicos superpuestos. La rigidez muscular se extiende para involucrar músculos axiales, principalmente abdominal y toracolumbar, así como músculos de las extremidades próximas. Típicamente, la co-contracción de músculos agonistas y antagonistas troncales lleva a una apariencia tipo tabla con hiperlordosis. Menos frecuentemente, la implicación del músculo respiratorio lleva a dificultad para tragar e implicación del músculo facial para una cara tipo máscara.

El tratamiento con globulina inmunitaria puede afectar los registros de rigidez disminuida y sensibilidad aumentada en pacientes con síndrome Moersch-Woltmann (Dalakas et al. (2001) N. Engl. J. Med. 345(26): 1870-6). Las co-formulaciones de globulina

inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a pacientes con síndrome Moersch-Woltmann usando los métodos descritos en la presente. Las dosificaciones ejemplares de IG en las co-formulaciones incluyen aquellas usadas para administración intravenosa de globulina inmunitaria a pacientes con síndrome Moersch-Woltmann. Por ejemplo, la globulina inmunitaria puede administrarse en dosis de 400 mg/kg de PC en cinco días consecutivos. Algunos pacientes se les pueden dar terapia de mantenimiento, que puede incluir, por ejemplo, 1-2 g/kg PC de globulina inmunitaria cada 4-6 semanas. La cantidad de globulina inmunitaria administrada puede incrementarse o disminuirse como sea apropiado.

3. Infecciones Agudas

La globulina inmunitaria también ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra un número de infecciones bacterianas, víricas y de hongos, incluyendo, pero no limitadas a, *Haemophilus influenzae* tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; estreptococos del grupo B; *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, y 23; adenovirus tipos 2 y 5; citomegalovirus; VCA del virus Epstein-Barr; virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus simple del herpes-1; virus simple del herpes-2; influenza A; sarampión; parainfluenza tipos 1, 2 y 3; polio; virus zoster de varicela; *Aspergillus*; y *Candida albicans*. De esta manera, las co-formulaciones de globulina/hialuronidasa inmunitarias pueden administrarse subcutáneamente a pacientes con infecciones bacterianas, víricas y de hongos para aumentar el sistema

inmunitario del paciente y tratar la enfermedad. En algunos ejemplos, los antibióticos u otros antimicrobiales también se administran.

5 **4. Otras Enfermedades y Afecciones**

Los ejemplos de otras enfermedades y afecciones tratables por terapia IG y no se describen arriba incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencia iatrogénica; deficiencia de anticuerpo específica; encefalomiелitis diseminada aguda; 10 vasculitis necrotizantes sistémica positiva ANCA; anemia hemolítica autoinmunitaria; penfigoide bulloso; penfigoide cicatricial; síndrome Evans (que incluye anemia hemolítica autoinmunitaria con trombocitopenia inmunitaria); trombocitopenia aloinmunitaria feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); 15 síndrome hemofagocítico; trasplante de células madre hematopoyéticas alogeneicas de alto riesgo; neuropatía paraproteinémica IgM; trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclono opsoclono; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgaris; purpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome Steven Johnson 20 (TEN/SJS); síndrome de choque tóxico; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; sepsis; trasplante de médula ósea; tumores de célula B; y enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, incluye tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (ver por ejemplo, Dodel et al. (2004) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75:1472-4; Solomon et al. (2007) Curr. Opin. Mol. Ther. 9:79-85; Relkin et al. (2008) Neurobiol Aging). IG contiene anticuerpos que enlazan a beta amiloide (AB), que es un componentes central de la placa en los

cerebros de pacientes con Alzheimer. De esta manera, IG puede ayudar a promover la evacuación de AB del cerebro y bloquea efectos tóxicos de AB en células del cerebro. Por lo tanto, las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse subcutáneamente a pacientes con enfermedad de Alzheimer usando los métodos descritos en la presente. Los sujetos a tratarse incluyen pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer suave, moderada o avanzada. Está dentro del nivel de experiencia de un médico que trata, identificar pacientes para tratamiento. Las co-formulaciones de globulina inmunitaria/hialuronidasa pueden administrarse cada semana, cada dos semanas, o una vez al mes. El tratamiento puede continuar sobre el curso de meses o años. Las co-formulaciones pueden administrarse en dosis de IG en o entre 200 mg/kg de PC hasta 2 g/kg PC cada semana o cada dos semanas, y generalmente al menos 200 mg/kg hasta 2 g/kg PC al menos una vez al mes. El tratamiento con globulina inmunitaria puede afectar un incremento en los niveles de anticuerpo beta anti-amiloide del paciente comparados con niveles antes del tratamiento.

I. Artículos de fabricación y kits

Las composiciones farmacéuticas de co-formulaciones de globulina inmunitaria e hialuronidasa pueden empacarse como artículos de fabricación que contienen material de empaquetado, una composición farmacéutica que es efectiva para tratar una enfermedad o afección tratable con IG, y una etiqueta que indica que la composición es para usarse para tratar las enfermedades y afecciones tratables con IG. Los ejemplares de artículos de

000195

fabricación son recipientes que incluyen recipientes de cámara sencilla y cámara doble. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a, tubos, botellas y jeringas. Los recipientes pueden incluir además una aguja para administración subcutánea.

5 Los artículos de fabricación proporcionados en la presente contienen materiales de empaquetado. Los materiales de empaquetado para uso en productos farmacéuticos empaquetados son bien conocidos para aquellos de experiencia en la técnica. Ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. Nos. 5,323,907, 5,033,252 y
10 5,052,558, cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad. Los ejemplos de materiales de empaquetado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, empaques alveolados, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas, y cualquier material de
15 empaquetado adecuado para una formulación seleccionada y modo pretendido de administración y tratamiento. Una configuración amplia de las formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en la presente se contempla ya que son una
variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o afección
20 tratable con IG.

Las composiciones de globulina inmunitaria y las co-formulaciones de hialuronidasa soluble también pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en la presente y un artículo para administración. Por ejemplo las composiciones pueden suministrarse con un dispositivo para administración, tal como una jeringa, un inhalador, una taza de dosificación, un gotero, o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para aplicación que incluyen dosificaciones,
000196

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

5 concentración, cantidad o actividad de IG.

J. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para propósitos ilustrativos solamente y no se pretenden para limitar el alcance

10 de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de Líquido Gammagard (Formulaciones de Inmunoglobulina (IG) al 10%)

15 El líquido Gammagard (IG al 10%) se fabricó de grupos grandes de plasma humana, seleccionados totalmente para agentes infecciosos. Las globulinas inmunitarias se purificaron de grupos de plasma usando un proceso de fraccionamiento de etanol frío Cohn-Oncley modificado (Cohn et al. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68:459-467), así como cromatografía de

20 intercambio de cationes y aniones (Teschner et al. (2007) Vox Sang. 92:42-55). La proteína purificada se sometió además a tres etapas de inactivación/eliminación víricas independientes: tratamiento de solvente/detergente (S/D) (Horowitz et al. (1994) Blood Coagul. Fibrin. 5(3):S21-S28; Kreil et al. (2003) Transfusion 43: 1023-1038), nanofiltración de 35 nm (Hamamoto et al. (1989) Vox Sang. 56:230-236; Yuasa et al. (1991) J. Gen. Virol. 72:2021-2024), y una incubación de pH bajo a temperaturas elevadas (Kempf et al. (1991) Transfusion 31:423-427; Louie et al. (1994) Biologicals 22:13-19).

procedimiento S/D incluye tratamiento con una mezcla orgánica del fosfato tri-n-butilo, octoxinol-9 y polisorbato-80 a 18 hasta 25°C durante un mínimo de 60 minutos (Polsler et al, (2008) Vox Sang. 94:184-192).

5 Las preparaciones finales usadas en los estudios fueron preparaciones líquidas al 10% de anticuerpos de inmunoglobulina G (IG) concentrada y altamente purificada formulados en glicina 0.25 mM en pH 4.6 hasta 5.1 (como se mide en la solución concentrada).

10 La glicina sirve como un agente estabilizante y amortiguante, y no se agregaron azúcares, sodio o conservadores. Todos los lotes de IG al 10% (por ejemplo lotes LE12H020, LE12H062, LE12H173, LE12F047) fueron sustancialmente similares. La osmolalidad fue 240 hasta 300 mOsmol/kg, que es similar a la osmolalidad fisiológica. La distribución de las subclases IG del producto fabricado de acuerdo al
15 proceso descrito arriba fue similar a aquel del plasma normal: al menos 98% de la preparación de proteína es IgG, la concentración IgA promedio fue 37 µg/mL (ninguno de estos lotes tiene una concentración IgA de > 140 µg/mL) e IgM estuvo presente sólo en cantidades mínimas.
20 Las funciones Fc y Fab se mantuvieron. La actividad activadora de pre-caliceína no fue detectable.

Ejemplo 2

Preparación de SUBQ NG 20% (IG al 20%)

A. Producción de una Composición IG purificada, concentrada

a. Resumen

Previamente el plasma agrupado congelado de donadores de sangre se separó en una muestra de plasma desprovisto de crioprecipitado para aislamiento de varios factores e inhibidores de coagulación como

antes de fraccionamiento de alcohol frío posterior usando un procedimiento de fraccionamiento Cohn modificado como se describe por Teschner et al. (2007) Vox Sang. 92:42-55. El procedimiento de fraccionamiento de alcohol da una fracción IG intermedia principal, referida como Precipitado G, que se procesó además para el producto final usando purificación cromatográfica. La fabricación corriente abajo involucra cromatografía de intercambio de cationes (flujo rápido de CM-Sefarosa) e intercambio de aniones (flujo rápido de ANX-Sefarosa). Para proporcionar un margen de seguridad alto con respecto a la transmisión de virus potencial, tres etapas de inactivación/eliminación del virus dedicadas, que se complementan una con la otra en su modo de acción, se integraron en el proceso de fabricación, particularmente: tratamiento de solvente/detergente (mezcla de Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-n-butilo al 0.3% y polisorbato-80 al 0.3%), nanofiltración (Asahi Planova 35 nm), y pH bajo (4.7) almacenamiento durante 3 semanas a temperatura elevada.

b. Separación de Crioprecipitados

Previamente el plasma agrupado congelado de donadores de sangre, ya verificado para consideraciones de seguridad y calidad, se descongeló a una temperatura no mayor que 6°C. La centrifugación en el frío se realizó para separar sólido y líquido, que se forma en el plasma descongelado. La porción líquida (también referida como "plasma desprovisto de crioprecipitado," después de que se removieron las proteínas insolubles en el frío por centrifugación de plasma descongelado fresco) luego se enfrió hasta $0 \pm 1^\circ\text{C}$, y su pH se ajustó hasta 7. El plasma desprovisto de crioprecipitado se usó para aislamiento de varios factores e inhibidores de coagulación crudos

antes del fraccionamiento de alcohol frío posterior. Siete trayectorias se eligieron para adsorción de lote de factores e inhibidores de coagulación crudos del plasma desprovisto de crioprecipitado antes de purificación SUBQ NG al 20% y se refieren como trayectorias 1 hasta 7 en la Tabla 3.

Tabla 3. Trayectorias para adsorción de lote de factores e inhibidores de coagulación de plasma desprovisto de crioprecipitado

Etapas	Gel	Heparina	Trayectorias de adsorción						
			1	2	3	4	5	6	7
Crioprecipitación	-	-	X	X	X	X	X	X	X
FEIBA	0.5 g de DEAE-Sephadex/L	-		X	X				
Factor IX	0.5 g de DEAE-Sephadex/L	2000 IU/mL				X	X	X	X
Factor VII	120 mg de Al(OH) ₃ /L	750 IU/mL						X	X
Antitrombina	1g de DEAE-Sephadex/L	80000 IU/mL			X		X	X	

Para producción SUBQ NG 20% pre-clínica, los materiales de partida Cohn derivados de las trayectorias 1 (plasma de fuente US sin etapas de adsorción), 3 (plasma de fuente US después de adsorción FEIBA, AT-III) y 6 (plasma de fuente US después de adsorción F-IX, F-VII, AT-III) se eligieron para cubrir una variedad amplia de etapas de adsorción diferentes antes del fraccionamiento de alcohol. Varios procesos de adsorción se describen en Teschner et al. (2007) Vox Sang. 92:42-55; Polsler et al. (2008) Vox Sang. 94: 184-192; Patente de E.U.A. Nos. 6,395,880 y 5,409,990; y Prothrombin complex: Brummelhuis in

000200

Methods of Plasma Protein Fractionation (J.M. Curling Editor, Academic Press, 1980).

c. Fraccionamiento

5 i. Obtener Sobrenadante del Fraccionamiento I

Mientras que el plasma se agitó, se agregó etanol pre-enfriado, a una concentración objetivo de etanol al 8% v/v, y la temperatura se disminuyó además hasta -2 hasta 0°C para permitir la precipitación. El sobrenadante (o Fraccionamiento I) se recolectó después de la centrifugación.

ii. Precipitado de los Fraccionamientos II y III

El fraccionamiento I se ajustó hasta pH 7 y concentración de etanol al 20 hasta 25 % v/v, mientras que la temperatura además se disminuyó. Posteriormente, se realizó centrifugación para separar el líquido (sobrenadante del Fraccionamiento II + III) y sólido.

iii. Extracción del Precipitado de los Fraccionamientos II y III

Una solución amortiguadora de extracción fría (fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, pH 4.5 ± 0.2, conductividad de 0.7 hasta 0.9 mS/cm) se usó para volver a suspender los Fraccionamientos II + III en una relación de 1:15 solución amortiguadora de extracción del precipitado. El proceso de extracción se realizó a 2 hasta 8°C.

iv. Tratamiento y Filtración de Sílice Fumante

Se agregó sílice fumante (por ejemplo, Aerosil 380) 000201

equivalente) a la suspensión a una concentración de alrededor de 40 g/kg de suspensión (o equivalente hasta 1.8 g/L de plasma desprovisto de crioprecipitado) y se mezcló a 2 hasta 8°C durante 50 hasta 70 minutos. Los líquidos y sólidos se separaron por 5 filtración a 2 hasta 8°C usando un auxiliar de filtro (Hyflo Super-Cel, World Minerals Inc., 0.5 kg/kg de suspensión), seguido por lavado posterior de la prensa de filtro con solución amortiguadora de extracción.

10 **v. Fraccionamiento del Precipitado G**

El filtrado se mezcló con polisorbato-80 a una concentración de alrededor de 0.2% p/v con agitación durante al menos 30 minutos a 2 hasta 8°C. El deshidrato de citrato de sodio luego se mezcló en la solución en 8 g/L durante otros 30 minutos de 15 agitación a 2 hasta 8°C. El pH luego se ajustó hasta 7.0 ± 0.1 con ya sea hidróxido de sodio 1M o ácido acético 1 M. Luego se agregó alcohol frío a la solución a una concentración de alrededor de 25% v/v, y se realizó una etapa de precipitación similar para Cohn II (Cohn et al. (1946) J. Am. Chem. Soc. 20 68:459-467).

vi. Suspensión de Precipitado G y Tratamiento de Solvente/Detergente

El precipitado se disolvió y filtró con un filtro profundo de un tamaño de poro nominal de 0.2 μm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado claro que se usó para el tratamiento de solvente/detergente (S/D).

La primera de las etapas en inactivación vírica es tratamiento S/D del Precipitado G resuspendido. La mezcla del

tratamiento S/D contiene Triton X-100 al 1.0 % (v/v), Tween-80 al 0.3 % (v/v), y fosfato de tri-n-butilo al 0.3 % (v/v), y la mezcla se mantuvo a 18 hasta 25°C durante al menos 60 minutos.

5 **d. Cromatografía de Intercambio de Cationes**

La solución de proteína que contiene S/D luego se pasó a través de una columna de intercambio de cationes (flujo rápido de carboximetil (CM)-Sefarosa) para remover el solvente y detergente. Después del lavado de reactivos S/D, las proteínas
10 absorbidas luego se eluyeron con solución amortiguadora de elución de pH alto (pH 8.5 ± 0.1).

e. Cromatografía de Intercambio de Aniones

15 El eluido luego se ajustó hasta pH 6 y diluyó a la conductividad apropiada antes la solución se pasó a través de la columna de intercambio de aniones equilibrada (flujo rápido de ANX-Sefarosa). El flujo a través de la columna durante la carga y lavado se recolectó para procesamiento adicional.

20

f. Nanofiltración

En la segunda de tres etapas de inactivación de virus, el efluente de columna de la última etapa se nanofiltró (filtro Asahi Planova 35nm) para generar un nanofiltrado.

g. Ultrafiltración y Diafiltración

La concentración de glicina del nanofiltrado se ajustó hasta 0.25 M y el nanofiltrado se concentró además a una concentración de

000203

proteína de 5 ± 1 % p/v por ultrafiltración y el pH se ajustó hasta 5.2 ± 0.2 . Con objeto de alcanzar una concentración de proteína superior para aplicación subcutánea, la ultrafiltración se llevo a cabo en un casete con un tamiz de canal abierto y membrana de ultrafiltración (Millipore Pellicon Biomax) con recorte de un peso molecular nominal (NMWCO) de 50 kDa o menos que fue especialmente diseñado para productos de alta viscosidad.

El concentrado se diafiltró contra una solución de glicina 0.25 M con un pH de 4.2 ± 0.2 . El volumen de intercambio mínimo fue 10x del volumen de concentrado original. A lo largo de la operación de ultrafiltración/diafiltración, la solución se mantuvo a 4 hasta 20°C. Después de la diafiltración, la solución se concentró a una concentración de proteína de mínimo 22 % p/v y se ajustó hasta 2 hasta 8°C.

Con objeto de recuperar la proteína residual completa en el sistema, por ello incrementar la concentración de proteína, el lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración más grande se hizo con al menos 2x del volumen muerto en modo de re-circulación para asegurar que toda la proteína se lavó. Luego el lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración se concentró a una concentración de proteína de al menos 22% p/v con un segundo sistema de ultra-/diafiltración equipado con el mismo tipo de membrana que se dimensionó en la decima parte o menos del primero. El concentrado del lavado posterior se agregó a la solución de volumen. El segundo sistema de ultrafiltración luego fue el lavado posterior y la temperatura de solución se ajustó hasta 2 hasta 8°C.

h. Formulación

Para la formulación, la concentración de proteína de la

000204

solución se ajustó hasta 20.4 ± 0.4 % p/v con lavado posterior del segundo sistema de ultrafiltración más pequeño y/o con solución amortiguadora de diafiltración. El pH se ajustó hasta 4.4 hasta 4.9, si es necesario.

5

i. Esterilización Adicional

La solución de volumen formulada se esterilizó además primero al filtrar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de 0.2 micras o menos, luego se dispensó asépticamente en los recipientes finales para sellado apropiado, con muestras tomadas para prueba. La etapa de inactivación/eliminación de virus final se realizó al almacenar los recipientes sellados a 30 hasta 32°C durante 21 hasta 22 días.

10

De esta manera, las formulaciones IG al 20% resultantes fueron formulaciones líquidas isotónicas, altamente purificadas de inmunoglobulina (al menos globulina gamma al 95%) formuladas en glicina 0.25 mM en pH 4.4 hasta 4.9. Las preparaciones finales usadas en los estudios fueron lotes SC00107NG, SC00207NG, y SC00307NG.

20

B. Caracterización de Lotes Pre-Clínicos

Los lotes pre-clínicos SC00107NG, SC00207NG, y SC00307NG se fabricaron en la escala de 200 L y caracterizaron de acuerdo con la Tabla 4. En el nivel de volumen final, la pureza de la preparación se ilustró por los niveles bajos de las impurezas principales, que están muy debajo de 0.1% del IgG total. La distribución de tamaño molecular (MSD) en el producto IG al 20%

000205

en la etapa final del proceso fue similar al MSD de un recipiente final de IG al 10% (Líquido Gammagard). Esto indica que incrementa la concentración hasta proteína al 20 % sin tener un impacto negativo en la integridad de la molécula IgG.

5

Tabla 4. Caracterización de lotes al 20% SUBQ NG

Prueba/ método	Lote	Volumen estéril		
		SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
Proteína total/UV	g/L de plasma	3.4	3.7	3.7
IgG/ nefelométrico	g/L de plasma	3.0	3.0	3.0
IgA/ELISA	g/L de plasma	<0.001	<0.001	<0.001
IgM/ELISA	g/L de plasma	<0.001	<0.001	<0.001
	% de agregados	0.1	0.1	0.1
	% de oligo/ dímeros	4.6	4.5	3.2
	% de monómeros	95.2	95.4	96.6
	% de fragmentos	0.1	0	0.1
Número de lote de material de partida		Precipita do G VNELG171	Precipita do G VNELG173	Precipita do G LB0790301

Los criterios de liberación del recipiente final preliminar se definieron en la base de los requerimientos de las autoridades de E.U.A y Europeas (FDA y EMEA) para inmunoglobulinas humanas

000206

subcutáneas, las especificaciones de los recipientes finales del producto actual para administración subcutánea (SUBCUVIA, autorizado para administración subcutánea en Europa) y las especificaciones del Líquido Gammagard. La caracterización de los espectros de anticuerpo relevantes de los tres recipientes finales se contempló y comparó con los resultados de los lotes Reducidos Víricamente Triples (TVR) IG al 10% pre-clínicos. La Tabla 5 compara los resultados de las titulaciones de anticuerpo y los factores de enriquecimiento de los tres recipientes finales al 20% SUBQ NG pre-clínicos y lotes de Líquido Gammagard pre-clínicos. Los resultados están en el mismo orden de magnitud para ambos lotes.

Tabla 5. Comparación de datos de liberación de SUBQ NG 20 % y IG TVR al 10 %

			SUBQ NG 20 %			10 % IG TVR		
			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG	P0010ING	P0020ING	P0030ING
						01C21AN11	01C21AN21	01D05AN11
	Sistema de Prueba	Unidad						
Bacterias:								
Corynebacterium diphtheriae EUR	Conejillos de Indias	IU/mL	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0	5.0
Virus								
HAV	ELISA	IU/mL	14.0	14.0	27.0	14	9	16
HBV (anticuerpo para hep Bs Ag)	ELISA	IU/mg TP	40.0	47.0	43.0	35.9	40.1	40.0
Virus de sarampión EUR Enrich. Factor	Hemag -glut.		41.0	41.0	24.0	n/a	n/a	n/a
Virus de sarampión US	Hemag -glut.	NIH 176	0.8	0.8	0	1.001	1.0	1.001
Parvo 619	ELISA	IU/mL	718	78	71	567	442	36
Virus tipo I de poliomielitis		NIHU/mL	1.4	1.711	1.5	1.01	1.11	1.21

Se realizaron pruebas de control de calidad adicionales para

000207

evaluar el nivel de impurezas del producto y relacionadas con el proceso. La Tabla 6 muestra los datos de control de calidad de los tres recipientes de SUBQ NG 20 % finales. La remoción de impurezas del producto y relacionadas con el proceso es satisfactorio, y todas las especificaciones preliminares relacionadas con el producto se cubren por los tres lotes.

Tabla 6. Pruebas de control de calidad de recipiente de SUBQ NG 20 % final

			SC0010 7NG	SC0020 7NG	SC0030 7NG
	Sistema de Prueba	Unidad			
Integridad funcional Fc	Enlazado a Bc	% de BPR lote 3	15.8	138	164
Actividad anti-complementaria	Método EP	%	41.1	41.5	41.2
Actividad anti-complementaria	Método EP	CH50 U/mg	41.4	41.8	41.6
Actividad de activador precalicreína, EUR	cromogénico	IU/mL	<0.6	1.004	1.237
Hemaglutininas anti-A, pH, Eur.	hemaglutinina	Dilución : 1	8	16	8
Hemaglutininas anti-B, pH, Eur.	hemaglutinina	Dilución : 1	4	4	2
Anti-D	hemaglutinina		cumple	cumple	Cumple
Exclusión de pirogenicidad, pH, Eur. y CFR	conejo	Elevación °C	Libre de pirógeno	Libre de pirógeno	Libre de pirógeno
Endotoxinas	cromogénico	IU/mL	<1.2	1.8	<1.2

000208

	Bacterianas Purificadas por electroforesis en acetato de celulosa	co CAE	%	99.6	99.8	99.5
5	Distribución de tamaño molecular (Monómero + Diméros) (Polímeros)	SE-HPLC	%	0.2	0.2	0.3
10	Distribución de tamaño molecular (Fragmentos)	SE-HPLC	%	0.6	0.5	0.5
	IgA - EUR	ELISA	µg/mL	20	20	30
	IgM	ELISA	µg/mL	1.1	1.0	1.2
	IgG	Nefelomet ría	mg/mL	177	165	163
15	Proteína (Volumen)	UV	mg/mL	201	203	202
	Proteína	Autom.N2	mg/mL	202	208	203
	Glicerina	HPLC	mg/mL	14.7	14.5	14.7
	Polisorbato 80	Espectrof ot.	µg/mL	<250	<250	<250
	TNBP	Cromat. Gas	µg/mL	<0.3	<0.3	<0.3
20	Octoxinol 9	Cromat. Ión	µg/mL	<3	<3	<3
	Esterilidad	Filtro de membrana	n/a	estéri 1	estéri 1	estéri 1
	Osmolaridad		mOsmol/k g	298	298	299
	pH, no diluido	Potencióm etro		5.1	5.2	5.3
	Apariencia	Inspec. Visual		satisf ace	satisf ace	satisf ace
	Etanol	Cromat. Gas	µg/mL	<20	<20	<20

000209

5	Isopropanol	Cromat. Gas	µg/mL	<20	<20	<20
	Aluminio AAS	Fotometrí a	µg/L	<50	<50	<50
	Silicio ICP OES	Electr. Ión	µg/L	3466	17270	21180
	Heparina		IU/mL	<0.007 5	<0.007 5	<0.007 5

Los parámetros en proceso vigilados durante la producción pre-clínica y la caracterización de intermediarios y el producto final muestran que no hubo diferencias obvias detectables entre los tres lotes. Todos los recipientes finales reúnen las especificaciones preliminares relacionadas con el producto sin tener en cuenta de que tipo de material de partida (Precipitado G VNELG171, VNELG173, o LB0790301) se eligió.

15 C. Estudio de almacenamiento de Formulación IG al 20 %

Con objeto de evaluar la estabilidad al almacenaje de los recipientes finales de IG al 20%, los 3 lotes pre-clínicos descritos antes (SC00107NG, SC00207NG, SC00307NG) y un lote de viabilidad (IgGSC 62/1) se almacenaron a 2 hasta 8 °C y 28 hasta 30 °C (sólo lote de viabilidad) por hasta 18 meses. Se usó cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño para determinar la distribución de tamaño molecular (MSD) y estabilidad de las muestras. El parámetro indicador de estabilidad principal es tamaño molecular, y un cambio en el tamaño puede ser el resultado de degradación por desnaturación, agregación o fragmentación.

Los MSD de los recipientes finales pre-clínicos después del almacenaje a 2 hasta 8 °C por hasta 12 meses se muestran en la

000210

Tabla 7. La Tabla 8 da los MSD del lote de viabilidad, IgGSC 62/1, a 2 hasta 8 °C y 28 hasta 30 °C, después del almacenaje por hasta 18 meses. Los datos confirman que el producto cumple con las especificaciones previamente definidas para los parámetros investigados por hasta 18 meses de almacenaje a 2 hasta 8°C y 28 hasta 30 °C.

Tabla 7. MSD de lotes IG al 20% pre-clínicos a 2 hasta 8 °C

Lote	Mes	MSD (HP-SEC) (%)		
		Agregados (>450 KDa)	Olig/Dímeros + Monómeros	Fragmentos (<70Kda)
SC00107NG	0	0.3	99.5	0.2
	3	0.4	99.5	0.2
	4	0.5	99.4	0.2
	6	0.5	99.3	0.2
	12	0.7	99.1	0.3
SC00207NG	0	0.3	99.5	0.2
	3	0.4	99.5	0.1
	4	0.5	99.3	0.2
	6	0.6	99.2	0.2
	12	0.8	99.0	0.2
SC00307NG	0	0.3	99.6	0.1
	3	0.5	99.3	0.2
	4	0.6	99.2	0.1
	6	0.7	99.1	0.2
	12	0.9	98.8	0.2
Criterios de liberación		<5	>90	<5

Tabla 8. MSD del lote de viabilidad IgGSC 62/1 a 2 hasta 8 °C y 28 hasta 30 °C

			MSD (HP-SEC) (%)		
Lote	°C	Mes	Agregados (>450 KDa)	Olig/Dímeros + Monómeros	Fragmentos (<70Kda)
IgGSC 62/1	2 to 8	0	0.2	99.5	0.3
		1	0.1	99.7	0.2
		3	0.2	99.6	0.2
		6	0.3	99.4	0.3
		12	0.4	99.3	0.3
		18	0.4	99.2	0.4
	28 to 30	0	0.2	99.5	0.3
		1	0.2	99.2	0.6
		3	0.3	98.7	1.0
		6	0.6	98.0	1.4
		12	1.2	95.6	3.2
		18	1.9	93.5	3.8
Criterios de liberación			<5	>90	<5

D. Estudios de Estabilidad de Varias concentraciones y formulaciones IG

La estabilidad al almacenaje de formulaciones de concentración de alta proteína (14-20 %) con pH bajo (glicina 0.25 M pH 4.4 - 4.9) se comparó con formulaciones de concentración de alta proteína con pH neutro (22.5 g/L glicina, 3 g/L NaCl, pH 7.0), que se usan actualmente para inmunoglobulinas intramuscularmente y subcutáneamente inyectables.

Todas las corridas inician con concentración del nanofiltrado hasta proteína al 5 %. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 10x contra glicina 0.15 M (concentración de glicina más baja investigada), seguido por la concentración final hasta un valor objetivo arriba de proteína al 20 % usando una membrana de poliétersulfona Millipore de 0.5 m² con un corte molecular de 30K (pantalla estándar). Los recipientes finales ya sea que se formularon y almacenaron a pH bajo (4.7) o se dio el

almacenaje a pH bajo en volumen y posteriormente se formularon a pH neutro (7.0) antes del almacenaje a ya sea 2 hasta 8 °C o 28 hasta 30 °C por 3 meses. Después de 3 meses, se determinó la distribución del tamaño molecular por cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño con objeto de determinar el contenido de agregado y fragmento. Se definieron los criterios de aceptación como: monómeros y oligo-/dímeros, > 90 %; agregados, < 5 %, fragmentos, < 5 %. Se probó la titulación ACA como se describe en la Farmacopea Europea. Se definió la titulación ACA aceptable como menos de 50 % de unidades CH50 consumidas por mg de proteína.

Las Tablas 9 y 10 muestran el contenido de agregado y fragmento así como titulación ACA después de 3 meses de almacenaje a 28 hasta 30 °C y 2 hasta 8 °C, respectivamente, para las formulaciones estándar (pH 4.7, glicina 0.25 M; o pH 7.0, 22.5 g/L glicina, 3 g/L NaCl) a diferentes concentraciones de proteínas. Los datos muestran claramente que la formulación de pH bajo tienen agregados inferiores y titulación ACA inferior después de 3 meses de almacenaje a 28 hasta 30 °C. Todas las titulaciones ACA de las formulaciones de pH 7.0 estuvieron arriba del criterio de aceptación definido para esta prueba.

Los resultados en 2 hasta 8°C confirman la tendencia apreciada en 28 hasta 30°C. Las titulaciones ACA todas estuvieron debajo del límite definido como criterio de aceptación, aunque las formulaciones de pH 7.0 se aprecia que tienen valores más altos. El valor de proteína no tiene influencia en los resultados de los parámetros probados.

000213

Tabla 9. Fragmento, agregado y valores ACA después de 3 meses de almacenaje a 28 hasta 30 °C a pH 4.7 y pH 7.0 a diferentes concentraciones de proteínas

Proteína	% de Fragmentos		% de Agregados		% de titulación ACA	
	pH 4.7	pH 7.0	pH 4.7	pH 7.0	pH 4.7	pH 7.0
14 %	1.35	1.50	0.10	0.92	44.1	52.0
16 %	1.24	1.38	0.08	0.91	40.5	53.1
18 %	1.24	1.60	0.11	0.93	40.3	52.4
20 %	1.35	1.52	0.12	0.93	37.5	62.7

Tabla 10. Fragmento, agregado y valores ACA después de 3 meses de almacenaje a 2 hasta 8 °C a pH 4.7 y pH 7.0 a diferentes concentraciones de proteínas

Proteína	% de Fragmentos		% de Agregados		Titulación ACA	
	pH 4.7	pH 7.0	pH 4.7	pH 7.0	pH 4.7	pH 7.0
14 %	0.36	1.80	0.16	1.09	38.3	46.5
16 %	0.30	0.51	0.11	1.01	37.4	44.7
18 %	0.33	1.10	0.17	0.86	35.8	39.8
20 %	0.33	1.98	0.20	1.06	36.1	46.0

La influencia de diferentes procedimientos de concentración en MSD y titulación ACA se investigó. El primer procedimiento usa una membrana Millipore de poliétersulfona de 0.5 m² con un corte molecular de 30K (pantalla estándar), como es descrito antes, y el segundo procedimiento usa una membrana Millipore de poliétersulfona de 0.5 m² con un tamiz abierto, apropiado para soluciones con viscosidad más alta. Las fracciones post-lavado se concentraron por un segundo dispositivo de ultra-/diafiltración con una superficie de membrana inferior (0.1 m², tamiz abierto) con objeto de reducir las pérdidas de rendimiento.

Las Tablas 11 y 12 muestran titulación MSD y ACA después de

000214

3 meses de almacenaje a 28 hasta 30 °C o 2 hasta 8 °C, respectivamente, para las formulaciones de pH bajo (4.7) a varias concentraciones de proteínas. Los datos muestran resultados similares después de 3 meses almacenamiento para ambos modos de concentración. Los valores obtenidos a 2 hasta 8 °C confirman los resultados obtenidos a 28 hasta 30 °C. El método de concentración no tiene influencia en la estabilidad del producto, aunque un post-lavado adecuado sólo puede obtenerse con membranas de tamiz abierto.

Tabla 11. Fragmento, agregado y valores ACA después de 3 meses de almacenaje a 28 hasta 30°C a pH 4.7 con diferentes métodos de concentración de proteína

Proteína	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Titulación ACA	
	tamiz estándar	tamiz abierto	tamiz estándar	tamiz abierto	tamiz estándar	tamiz abierto
14 %	1.35	0.92	0.10	0.21	44.1	42.6
16 %	1.24	1.09	0.08	0.20	40.5	40.9
18 %	1.24	0.96	0.11	0.23	40.3	40.7
20 %	1.35	0.98	0.12	0.30	37.5	41.6

Tabla 12. Fragmento, agregado y valores ACA después de 3 meses de almacenaje a 2 hasta 8°C a pH 4.7 con diferentes métodos de concentración de proteína

Proteína	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Titulación ACA (%)	
	tamiz estándar	tamiz abierto	tamiz estándar	tamiz abierto	tamiz estándar	tamiz abierto
14 %	0.36	0.27	0.16	0.17	38.3	39.6
16 %	0.30	0.22	0.11	0.14	37.4	38.3
18 %	0.33	0.23	0.17	0.18	35.8	39.6
20 %	0.33	0.22	0.20	0.20	36.1	39.9

Ejemplo 3**Preparación de PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)****A. Generación de una Línea celular que expresa rHuPH20 soluble**

El plásmido HZ24 (establecido en SEQ ID NO: 52) se usó para
5 transfectar Ovario de Hámster Chino (células CHO) (ver por
ejemplo solicitudes Nos. 10,795,095, 11/065,716 y 11/238,171). El
vector del plásmido HZ24 para expresión de soluble rHuPH20
contiene una columna de vector pCI (Promega), aminoácidos que
codifican ADN 1-482 de hialuronidasa PH20 humana (SEQ ID NO:49,
10 un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) del virus ECMV
(Clontech), y el gen de reductasa de dihidrofolato de ratón
(DHFR). La columna de vector pCI también incluye ADN que codifica
el gen de resistencia a la Beta-lactama (AmpR), un origen de
replicación fl, una región aumentadora/promotora inmediata-
15 temprana de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, y una
señal de poliadenilación tardía SV40 (SV40). El ADN que codifica
el constructo rHuPH20 contiene un sitio NheI y una secuencia de
consenso Kozak antes del ADN que codifica la metionina en la
posición del aminoácido 1 de la secuencia de señal del aminoácido
20 35 de PH20 humana, y un codón de paro que sigue al ADN que
codifica la tirosina que corresponde a la posición 482 del
aminoácido de la hialuronidasa PH20 humana (establecida en SEQ ID
NO: 1), seguido por un sitio de restricción BamHI. El constructo
pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), por lo tanto, resulta en una
especies de mRNA sencillo conducida por el promotor CMV que
codifica los aminoácidos 1-482 del PH20 humano (establecido en
SEQ ID NO:3) y los aminoácidos 1-186 de dihidrofolato reductasa
de ratón (establecida en SEQ ID NO:53), separada por el sitio de

000216

entrada ribosomal interna (IRES).

Células DG44 CHO no transfectadas que crecen en medio CD-HO modificado con GIBCO para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y 18 mL/L Pluronic F68/L (Gibco), se sembraron a 0.5 x 10⁶ células/mL en un matraz agitado en preparación para transfección. Se hicieron crecer las células a 37° C en CO₂ al 5 % en un incubador humidificado, agitando a 120 rpm. Se probaron células DG44 CHO no transfectadas que crecen exponencialmente para viabilidad prior antes de la transfección.

Se peletizaron sesenta millones de células viables del cultivo de célula DG44 CHO no transfectada y volvieron a suspenderse hasta una densidad de 2 x 10⁷ células en 0.7 mL de solución amortiguadora de transfección 2x (2x HeBS: Hepes 40 mM, pH 7.0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1.4 mM, dextrosa 12 mM).

A cada alícuota de células re-suspendidas, 0.09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 linealizado (linealizado por digestión durante la noche con Cla I (New England Biolabs)) se agregó, y las soluciones célula/ADN se transfirieron en cubetas de electroporación BTX de 0.4 cm de espacio (Gentronics) a temperatura ambiente. Una electroporación de control negativa se realizó sin ADN plásmido mezclado con las células. Las mezclas célula/plásmido se electroporaron con un capacitador de descarga de 330 V y 960 µP o a 350 V y 960 µP.

Se removieron las células de las cubetas después de la electroporación y se transfieren en 5 mL de medio CD-CHO Modificado para células DHFR(-), complementado con glutamina 4 mM y 18 mL/L Pluronic F68/L (Gibco), y se permite crecer en un pozo de una placa de cultivo de tejido de 6 pozos sin selección por 2

días a 37° C en CO₂ al 5% en un incubador humidificado.

Dos días después de la electroporación, se removió 0.5 mL de medio de cultivo de tejido de cada pozo y se prueba para la presencia de actividad de hialuronidasa, usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4.

Tabla 13. Actividad de hialuronidasa inicial de células DG44 CHO transfectadas con HZ24 a 40 horas después de la transfección

	Dilución	Actividad (Unidades/mL)
Transfección 1 (330V)	1 a 10	0.25
Transfección 2 (350V)	1 a 10	0.52
Control Negativo	1 a 10	0.015

Se recolectaron las células de la transfección 2 (350V) del primer pozo de cultivo de tejido, se cuenta y diluye hasta 1×10^4 a 2×10^4 células viables por mL. Se transfirió una alícuota de 0.1 mL de la suspensión celular a cada 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 las células (volumen final 0.2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas de crecimiento sin metotrexato.

000218

Tabla 14. Actividad de hialuronidasa de clones identificados

ID Placa/Pozo	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 se transfieren en matraces de agitación como suspensiones celulares sencillas. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, y 4D10 se colocaron en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pozos usando la estrategia de dilución infinita bi-dimensional en la cual las células se diluyen 1:2 de la placa, y 1:3 a través de la placa, iniciando a 5000 células en el pozo de la parte superior izquierda. Se hicieron crecer los clones diluidos en un respaldo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pozo, para proporcionar factores de crecimiento necesario para los días iniciales en cultivo. Se hicieron diez placas 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 con metotrexato 50 nM). Se midió la actividad de hialuronidasa importante en los sobrenadantes desde 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. Se

expandió además el clon 3D35M en metotrexato 500 nM dando lugar a clones producidos en exceso de 1,000 Unidades/mL en matraces de agitación (clon 3D35M; o Gen1 3D35M). Se preparó entonces un banco de célula maestro (MCB) de las células 3D35M.

5

B. Producción y Purificación de Gen1 Humano PH20

a. Proceso de Bioreactor de 5 L

Un vial de 3D35M se descongeló y expandió de matraces de agitación a través de matraces centrífugos de 1 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) complementado con metotrexato 100 nM y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Se transfirieron las células de los matraces centrífugos a un bioreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4×10^5 células viables/mL. Los parámetros fueron: temperatura de punto de ajuste: 37 °C; pH: 7.2 (partiendo del punto de ajuste); punto de ajuste de oxígeno disuelto: 25 %; y recubierta de aire: 0-100 cc/min. A 168 hrs, se agregó 250 mL de Medio de Alimentación #1 (CD CHO con 50 g/L glucosa). A 216 horas, se agregó 250 mL de Medio de Alimentación #2 (CD CHO con 50 g/L glucosa y butirato de sodio 10 mM), y a 264 horas se agregó 250 mL de Medio de Alimentación #2. Este proceso resulta en una productividad final de 1600 Unidades/mL con una densidad celular máxima de 6×10^6 células/mL. La adición de butirato de sodio fue para aumentar dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las fases finales de producción.

El medio acondicionador del clon 3D35M se clarificó por filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en HEPES 10 mM pH 7.0. Se purificó entonces el rHuPH20 soluble por cromatografía secuencial en intercambio de iones Q Sepharose

000220

(Pharmacia), cromatografía de interacción hidrofóbica de fenil sefarosa (Pharmacia), boronato de fenilo (Prometics) y cromatografía de hidroxapatita (Bio-Rad, Richmond, CA).

La rHuPH20 soluble se une a Q Sepharose y eluye en NaCl 400 mM en la misma solución amortiguadora. El eluido se diluyó con sulfato de amonio 2M hasta una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se pasa a través de la columna de Fenil Sefarosa (sub baja), seguido por unión bajo las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. Se eluyó la rHuPH20 soluble de la resina de FenilSefarosa en Hepes pH 6.9 después de lavar a pH 9.0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El eluido se cargó en una resina de hidroxapatita cerámica a pH 6.9 en fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 1 mM y se eluye con fosfato de potasio 80 mM, pH 7.4 con CaCl_2 0.1 mM.

La rHuPH20 soluble purificada resultante posee una actividad específica en exceso de 65,000 USP Unidades/mg de proteína por medio del ensayo de microturbidez (Ejemplo 4) usando el estándar de referencia USP. La rHuPH20 soluble purificada se eluye como un pico sencillo desde 24 hasta 26 minutos de una columna de divinilbenceno estireno 5RPC Pharmacia con un gradiente entre 0.1% TFA/ H_2O y 0.1% TFA/90% acetonitrilo/10% H_2O y se resuelve como una banda de 61 kDa amplia sencilla por electroforesis SDS que reduce a una banda de 51 kDa definida durante el tratamiento con PNGASE-F. La formación de secuencia de aminoácido de terminal N revela que el péptido líder se ha removido eficientemente.

b. Proceso de Expansión del Cultivo Celular Cadena Arriba en 100

L de Cultivo Celular de Bioreactor

000221

Se usó un proceso escalado para purificar de manera separada rHuPH20 de cuatro viales diferentes de célula 3D35M para producir 4 lotes separados de rHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C soluble. Cada vial se expandió de forma separada y se
5 cultiva a través de un bioreactor de 125 L, luego se purifica usando cromatografía de columna. Se tomaron las muestras a través del proceso para evaluar parámetros tales como rendimiento de enzima. La descripción del proceso proporcionada enseguida establece las especificaciones representativas para tales cosas
10 como inicio del bioreactor y volúmenes medios de alimentación, densidades de transferencia de célula, y volúmenes de lavado y elución. Los números exactos varían ligeramente con cada lote, y se detallan en las Tablas 15 a 22.

Se descongelaron cuatro viales de células 3D35M en un baño
15 de agua a 37°C, se agregó CD CHO que contiene metotrexato 100 nM y 40 mL/L de GlutaMAX™-1 y se centrifugan las células. Las células se volvieron a suspender en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio fresco y se colocan en un incubador a 37°C, CO₂ al 7%. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz de
20 agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10⁶ células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. Se incubó el matraz a 37°C, CO₂ al 7%. Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10⁶ células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 250 mL en un volumen de cultivo de 200 mL, y el matraz se incubó a 37°C, CO₂ 7%, Cuando la densidad celular alcanza 1.5 - 2.5 x 10⁶ células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO₂ 7%.

000222

Cuando la densidad celular alcanza $1.5 - 2.5 \times 10^6$ células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 6 L en 5 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C , CO_2 7%. Cuando la densidad celular alcanza $1.5 - 2.5 \times 10^6$ células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 36 L en 20 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C , CO_2 7%.

Se esteriliza un reactor de 125 L con vapor a 121°C , 1.40 kg/cm² (20 psi) y se agregó 65 L de medio CD CHO. Antes de usar, el reactor se revisó para contaminación. Cuando la densidad celular en los matraces centrífugos de 36 L alcanzan $1.8 - 2.5 \times 10^6$ células/mL, se transfirieron 20 L del cultivo celular de los matraces centrífugos de 36 L al bioreactor de 125 L (Braun), lo que resulta en un volumen final de 85 L y una densidad de sembrado de aproximadamente 4×10^5 células/mL. Los parámetros fueron: temperatura de punto de ajuste: 37°C ; pH: 7.2; oxígeno disuelto: $25\% \pm 10\%$; velocidad del impulsor: 50 rpm; presión del recipiente: 0.21 kg/cm² (3 psi); aspersion del aire: 1 L/min.; recubrimiento de aire: 1 L/min. El reactor se puso en muestra diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis de medio, producción y retención de proteína. Se agregaron alimentos nutrientes durante la corrida. El día 6, 3.4 L del Medio de Alimentación #1 (CD CHO + 50 g/L glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1) se agregó, y se cambió la temperatura de cultivo hasta 36.5°C . El día 9, se agregó 3.5 L de Alimentación #2 (CD CHO + 50 g/L glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L butirato de sodio), y se cambió la temperatura de cultivo hasta 36°C . El día 11, 3.7 L de Alimentación #3 (CD CHO + 50 g/L glucosa + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1.1 g/L butirato de sodio) se agregó, y se cambió la temperatura

000223

de cultivo hasta 35.5°C. El reactor se cosechó a 14 días, o cuando la viabilidad de las células cae debajo de 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. Al cosechar, el cultivo se colocó en muestras para micoplasma, biocarga, endotoxina, y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopio de transmisión de electrones (TEM) para partículas víricas, y actividad de enzima.

Se filtró el cosechado de cultivo celular de bioreactor de 100 L a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tienen un medio de poliétersulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de 8.0 µm de profundidad, una cápsula de 0.65 µm de profundidad, una cápsula de 0.22 µm, y finalmente a través de un filtro Sartopore 0.22 µm 2000 cm² y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. Se concentró el cultivo 10x usando dos TFF con filtros de Poliétersulfona en espiral 30 kDa MWCO (Millipore), seguido por un intercambio de solución amortiguadora 6x con 10 mM HEPES, Na₂SO₄ 25 mM, pH 7.0, en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenaje estéril de 20 L. La Tabla 15 proporciona datos vigilados relacionados al cultivo celular, cosechado, concentración y etapas de intercambio de solución amortiguadora.

Tabla 15. Datos vigilados para cultivo celular, cosechado, concentración y etapas de intercambio de solución amortiguadora

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Tiempo desde descongelado a inoculado bioreactor de 100 L (días)	21	19	17	18

000224

	Densidad de inoculación ed 100 L ($\times 10^6$ células/ml)	0.45	0.33	0.44	0.46
	Tiempo de doblaje en crecimiento logarítmico (hr)	29.8	27.3	29.2	23.5
5	Densidad máx. celular ($\times 10^6$ células/ml)	5.65	8.70	6.07	9.70
	Viabilidad de cosecha (%)	41	48	41	41
	Concentración de cosecha (U/ml)	1964	1670	991	1319
	Tiempo en el bioreactor de 100 L (días)	13	13	12	13
10	Volumen de cosecha clarificado (mL)	81800	93300	91800	89100
	Ensayo de enzimas de cosecha clarificada (U/ml)	2385	1768	1039	1425
	Ensayo de enzimas concentradas (U/ml)	22954	17091	8561	17785
15	Ensayo de enzimas concentrado con intercambio de solución amortiguadora (U/ml)	15829	11649	9915	8679
	Ensayo de enzimas concentrado con intercambio de solución amortiguadora filtrada (U/ml)	21550	10882	9471	8527
20	Volumen de concentrado de intercambio de solución amortiguadora (ml)	10699	13578	12727	20500
	Relación Concentración/cosecha unidades de enzimas	0.87	0.96	1.32	1.4

Se preparó una columna Q Sefarosa (Pharmacia) de intercambio iónico (3 L de resina, altura = 20 cm, Diámetro = 14 cm). Se recolectaron las muestras de lavado para una determinación del pH, conductividad y ensayo de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM,

000225

pH 7.5. Se cargó el cosechado diafiltrado, concentrado en la columna Q a una relación de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes 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 5 Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.0, y filtra a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril.

A continuación se realizó la cromatografía de interacción hidrofóbica de fenil Sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna de fenil sefarosa (PS) (9.1 L resina, Altura = 29 cm, Diámetro = 10 20cm). La columna se equilibró con 5 volúmenes 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 fue complementado con sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y soluciones de reserva CaCl_2 1 M hasta concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 15 0.1 mM, respectivamente. Se cargó la proteína en la columna PS a una relación de flujo de 100 cm/hr. Se agregó fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y CaCl_2 0.1 mM, pH 7.0, a 100 cm/hr. El flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril.

20 La proteína purificada por PS se cargó entonces en una columna de aminofenil boronato (ProMedics) (6.3 L resina, Altura = 20 cm, Diámetro = 20cm) que se ha equilibrado con 5 volúmenes 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 relación 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 se lavó entonces con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9.0, y la proteína se eluye con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6.9, a través de un filtro estéril y

000226

en una bolsa estéril de 20 L. Se probó el eluido para biocarga, concentración de proteínas y actividad de enzima.

Se equilibró una columna de hidroxapatita (HAP) (Bio-Rad) (1.6 L resina, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm) con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0.1 mM, pH 7.0. Se colectaron muestras de lavado y probaron para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La proteína purificada por aminofenil boronato fue complementada con fosfato de potasio y CaCl₂ para proporcionar concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y CaCl₂ 0.1 mM, luego se cargó sobre la columna HAP a una relación de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0.1 mM, luego fosfato de potasio 10 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 0.1 mM, pH. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0, y se filtra a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 5 L. Se probó el eluido para biocarga, concentración de proteínas y actividad de enzima.

La proteína purificada por HAP se bombeó entonces a través de un filtro de remoción vírico de 20 nM por medio de un tanque de presión. La proteína se agregó al tanque de presión DV20 y el filtro (Pall Corporation), se pasa a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento de 20 L estéril. El filtrado se probó para concentración de proteínas, actividad de enzima, oligosacárido, monosacárido y perfilado de ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado se concentró entonces hasta 1 mg/mL usando un sistema de filtración de flujo tangencial Sartoclon Slice (TFF) de corte de peso

molecular 10 kDa (MWCO) (Sartorius). Se preparó primero el filtro al lavar con una solución salina/Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7.0) y el permeado se puso en muestra para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se puso en muestra y probó para concentración de proteína y actividad de enzima. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6x 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 de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se puso en muestra y probó para concentración de proteínas, actividad de enzima, grupos sulfhidrilo libres, perfilado de oligosacáridos y osmolaridad.

Las Tablas 16 hasta 22 proporcionan datos vigilados con relación a cada una de las etapas de purificación anteriores, para cada lote de célula 3D35M.

Tabla 16. Datos de columna Q 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 de eluido (mL)	6108	5923	5759	6284
Conc. de proteína de Eluido (mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
Ensayo de Enzima Eluida (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento de enzima (%)	65	107	87	76

Tabla 17- Datos de columna de fenil sefarosa

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de la adición	5670	5015	5694	6251

000228

5

de solución de reserva (mL)				
Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8390
Volumen de 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
Conc. de proteína de eluido (mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
Ensayo de eluido de enzima (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de proteína (%)	41	40	36	37
Rendimiento de enzima (%)	102	88	82	96

10

Tabla 18. Datos de columna de amino fenil boronato

15

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 columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen de eluido (mL)	17595	22084	20686	19145
Conc. de proteína de Eluido (mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
Conc. de proteína de Eluido Filtrado (mg/mL)	No probado	0.03	0.00	0.04
Ensayo de Enzima Eluida (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de proteína(%)	0	11	11	12
Rendimiento de enzima (%)	No determinado	41	40	69

20

Tabla 19. Datos de columna de hidroxapatita

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen antes de adición de solución madre (mL)	16345	20799	20640	19103
Relación de volumen de	10.95	13.58	14.19	12.81

000223

	carga/volumen de resina				
	Volumen de columna (mL)	1500	1540	1462	1500
	Volumen de carga (mL)	16429	20917	20746	19213
	Volumen de eluido (mL)	4100	2415	1936	2419
5	Conc. de proteína de Eluido (mg/mL)	No probado	0.24	0.17	0.23
	Conc. de proteína de 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
10	Rendimiento de enzima (%)	87	118	140	104

Tabla 20. Datos de filtración DV20

	Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
	Volumen de inicio (mL)	4077	2233	1917	2419
15	Volumen de filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
	Conc. de proteína de Filtrado (mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
	Conc. de proteína de Eluido Filtrado (mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
	Rendimiento de proteína(%)	No probado	93	82	101

Tabla 21. Datos de concentración final

	Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
	Volumen de inicio (mL)	4575	3298	2963	3492
	Volumen de concentrado (mL)	562	407	237	316
	Conc. de proteína de concentrado (mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
	Rendimiento de proteína(%)	111	102	103	98

Tabla 22. Datos de intercambio de solución amortiguadora en formulación final

Parámetro	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Volumen de inicio (mL)	562	407	237	316
Concentrado intercambiado de solución amortiguadora de volumen final (mL)	594	516	310	554
Conc. de proteína de concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Conc. de proteína de 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 llenó asépticamente en viales estériles con 5 mL y 1 mL de volúmenes de llenado. La proteína se pasó a través de un filtro de 0.22 µm a una bomba controlada por operador que se usó para llenar los viales usando un lector gravimétrico. Los viales se cerraron con tapones y aseguraron con tapones alabeados. Los viales cerrados se inspeccionaron visualmente para partículas externas y luego se etiqueta. Después del etiquetado, los viales se congelaron al instante al sumergir en nitrógeno líquido por no más de 1 minuto y se almacena a ≤- 15 °C (-20 ± 5 °C).

C. Producción de células Gen2 que contienen PH20 humano soluble (rHuPH20)

La línea celular Gen1 3D35M descrita antes se adaptó hasta niveles de metotrexato más altos para producir clones de generación 2 (Gen2). Las células 3D35M se sembraron a partir de cultivos que contienen metotrexato establecido en medio CD CHO que contiene GlutaMAX™-1 4mM y metotrexato 1.0 µM. Se adaptaron las células hasta un nivel de metotrexato más alto al hacerle

crecer y pasarlas 9 veces durante un periodo de 46 días en un incubador humidificador de CO₂ al 7%, 37 °C. La población amplificada de células fue clonada por una dilución limitante en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos que contienen medio con 2.0 µM de metotrexato. Después de aproximadamente 4 semanas, se identificaron los clones y el clon 3E10B se seleccionó para expansión. Se hicieron crecer las células 3E10B en medio CD CHO que contiene GlutaMAX™-1 4 mM y 2.0 µM de metotrexato por 20 pasajes. Un banco de célula maestra (MCB) de la línea celular 3E10B se creó y congeló y se usa para estudios posteriores.

La amplificación de la línea celular continúa al cultivar células 3E10B en medio CD CHO que contiene GlutaMAX™-1 4 mM y 4.0 µM de metotrexato. Después del décimo segundo pasaje, se congelaron las células en viales como un banco de célula de investigación (RCB). Un vial del RCB se descongeló y cultivó en el 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 más tarde. Las células del octavo pasaje en el medio que contiene 20.0 µM de metotrexato se clonaron al limitar la dilución en placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contiene medio CD CHO que contiene GlutaMAX™-1 4 mM y 20.0 µM metotrexato. Se identificaron los clones 5-6 semanas más tarde y el clon 2B2 se seleccionó para expansión en medio que contiene 20.0 µM metotrexato. Después del décimo primer pasaje, se congelaron células 2B2 en viales como un banco de célula de investigación (RCB).

Las células 2B2 resultantes son deficientes en células DG44 CHO de dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan PH20 humano

000232

recombinante soluble (rHuPH20). La rHuPH20 soluble se presenta en células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis southern blot de ADN de célula 2B2 genómico digerido en Spe I-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica de rHuPH20 revela el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda hibridizada principal de ~7.7 kb y cuatro bandas hibridizantes menores (~13.9, ~6.6, ~5.7 y ~4.6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación principal de ~5.0 kb y dos bandas de hibridación menores (~13.9 y ~6.5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación sencilla de ~1.4 kb observada usando ADN 2B2 digerido con BamH I/Hind III. El análisis de secuencia del transcripto de mRNA indica que el cADN derivado (SEQ ID NO:56) fue idéntico a la secuencia de referencia (SEQ ID NO:49) excepto para una diferencia de par base en la posición 1131, que se observó para ser una timidina (T) en lugar de la citosina esperada (C). Esta es una mutación silenciosa, que no se efectúa en la secuencia de aminoácido.

D. Producción de rHuPH20 soluble en Gen2 en cultivo de célula de bioreactor de 300 L

Un vial de HZ24-2B2 se descongeló y expandió de matraces de agitación a través de matraces centrífugos de 36 L en medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 20 μ M de metotrexato y GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Brevemente, el vial de células se descongeló en un baño de agua a 37 °C, se agregó medio y se centrifugaron las células. Las células se volvieron a suspender en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio

000233

fresco y se coloca en un incubador de CO₂ al 7 % a 37 °C. Las células se expandieron por hasta 40 mL en el matraz de agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanza más del 1.5×10^6 células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 125 mL en 100 mL de volumen de cultivo. El matraz se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanza más de 1.5×10^6 células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 250 mL en un volumen de cultivo de 200 mL, y el matraz se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanza más de 1.5×10^6 células/mL, se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanza más de 1.5×10^6 células/mL se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 6 L en 5000 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %. Cuando la densidad celular alcanza más de 1.5×10^6 células/mL se expandió el cultivo en un matraz centrífugo de 36 L en 32 L de volumen de cultivo y se incubó a 37 °C, CO₂ al 7 %.

Se esterilizó un reactor de 400 L y 230 mL de medio CD CHO se agregó. Antes de usar, se revisó el reactor para contaminación. Aproximadamente se transfirieron 30 L de células de los matraces centrífugos de 36L al bioreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4.0×10^5 células viables por mL y un volumen total de 260L. Los parámetros fueron: temperatura de punto de ajuste: 37°C; velocidad del impulsor 40-55 rpm; presión del recipiente: 0.21 kg/cm² (3 psi); aspersión del aire: 0.5- 1.5 L/Min.; recubrimiento de aire: 3 L/min. El reactor se puso en muestra diariamente para conteo celular, verificación de pH, análisis de medio, producción y retención de proteína. También,

000234

durante la corrida se agregaron los nutrientes de alimentación. A 120 hrs (día 5), 10.4 L de Medio de Alimentación #1 (4 x CD CHO + 33 g/L glucosa + 160 mL/L GlutaMAX™-1 + 83 mL/L yeastolato + 33 mg/L rHuInsulina) se agregó. A 168 horas (día 7), 10.8 L de Alimentación #2 (2x CD CHO + 33 g/L glucosa + 80 mL/L GlutaMAX™-1 + 167 mL/L yeastolato + 0.92 g/L butirato de sodio) se agregó, y se cambió la temperatura de cultivo hasta 36.5°C. A 216 horas (día 9), 10.8 L de Alimentación #3 (1 x CD CHO + 50 g/L glucosa + 50 mL/L GlutaMAX™-1 + 250 mL/L yeastolato + 1.80 g/L butirato de sodio) se agregó, y se cambió la temperatura de cultivo hasta 36 °C. A 264 horas (día 11), 10.8 L de Alimentación #4 (1 x CD CHO + 33 g/L glucosa + 33 mL/L GlutaMAX™-1 + 250 mL/L yeastolato + 0.92 g/L butirato de sodio) se agregó, y se cambió la temperatura de cultivo hasta 35.5 °C. Se observó que la adición del medio de alimentación aumenta dramáticamente la producción de rHuPH20 soluble en las fases finales de producción. El reactor se cosechó en 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cae debajo de 40%. El proceso resulta en una productividad final de 17,000 Unidades/mL con una densidad celular máxima de 12 millones de células/mL. Al cosechar, el cultivo se colocó en muestras para micoplasma, biocarga, endotoxina y viral in vitro e in vivo, microscopio de transmisión de electrones (TEM) y actividad de enzima.

Se bombeó cultivo por una bomba peristáltica a través de cuatro módulos de sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, cada una contiene una capa de tierra diatomácea graduada de 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

000235

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 $<0.1 \mu\text{m}$, 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 fue complementado con EDTA 10 mM y Tris 10 mM hasta un pH de 7.5. Se concentró el cultivo 10x con un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de poliéter sulfona (PES) de corte de peso molecular 30 kDa (MWCO) Sartoslice TFF (Sartorius), seguido por un intercambio de solución amortiguadora 10x con Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7.5, en un filtro final de 0.22 μm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

El cosechado diafiltrado, concentrado se inactivó para virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 al 10%, fosfato de tri-n-butilo (TNBP) al 3%. El cosechado diafiltrado, concentrado se expuso a Triton X-100 al 1%, TNBP al 0.3% por 1 hora en un recipiente de reacción de vidrio de 36 L inmediatamente antes de la purificación en la columna Q.

E. Purificación de rHuPH20 soluble en Gen2

Se preparó una columna de intercambio de iones de Q Sepharose (Pharmacia) (9 L resina, H= 29 cm, D= 20 cm). Se colectaron muestras de lavado para la determinación de pH, conductividad y ensayo de endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM,

000236

pH 7.5. Después de la inactivación viral, el cosechado diafiltrado, concentrado se cargó en la columna Q a una relación de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes 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, en un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteínas y actividad de hialuronidasa. Se tomaron las lecturas de absorbancia A280 al inicio y al final del intercambio.

10 A continuación se realizó la cromatografía de interacción hidrofóbica Fenil sefarosa (Pharmacia). Se preparó una columna fenil sefarosa (PS) (19-21 L resina, H=29 cm, D= 30 cm). El lavado se colectó y colocó en muestra para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes

15 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 la columna Q Sepharose fue complementado 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 y 0.1 mM, respectivamente.

20 Se cargó la proteína en la columna PS a una relación de flujo de 100 cm/hr y se colecta el flujo que atraviesa la columna. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y CaCl_2 0.1 mM, pH 7.0, a 100 cm/hr y el lavado se agregó al flujo transversal colectado. Combinado con el lavado de columna, el flujo continuo se pasó a través de un filtro final de 0.22 μm en una bolsa estéril. El flujo continuo se puso en muestra para biocarga, concentración de proteínas y actividad de enzima.

Se preparó una columna de aminofenil boronato (ProMetic). El lavado se colectó y se puso 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.

5 El flujo transversal PS que contiene proteína purificada se cargó en la columna de aminofenil boronato a una relación 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
10 bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9.0. La proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6.9, y se pasa a través de un filtro estéril en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteínas y actividad de enzima.

Se preparó la columna de hidroxapatita (HAP) (Bio-Rad). El
15 lavado se colectó 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 de aminofenil boronato purificada se complementó hasta concentraciones finales
de fosfato de potasio 5 mM y CaCl_2 0.1 mM y se carga en la
20 columna HAP a una relación 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. La columna se lavó a continuación con fosfato de potasio 10 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM, CaCl_2 0.1 mM. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0, y se pasa a través de un filtro estéril de 0.22 μm en una bolsa estéril. La muestra eluida se probó para biocarga, concentración de proteínas y actividad de enzima.

La proteína HAP purificada se pasó entonces a través de un

000232

filtro de remoción vírica. El filtro Viosart esterilizado (Sartorius) se preparó primero al lavar con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0. Antes de usar, la solución amortiguadora filtrada se puso en muestra para pH y conductividad. La proteína HAP purificada se bombeó por medio de una bomba peristáltica a través del filtro de remoción vírico de 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 μ m en una bolsa estéril. La muestra filtrada vírica se probó para concentración de proteínas, actividad de enzima, oligosacárido, monosacárido y perfilado de ácido siálico. La muestra también se probó para impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado se concentró entonces hasta 10 mg/mL usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocn Slice de 10 kD de corte de peso molecular (MWCO) (Sartorius). El filtro se preparó primero al lavar con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0, y el permeado se puso en muestra para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se puso en muestra y probaron para concentración de proteínas y actividad de enzima. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6x en la proteína concentrada en la solución amortiguadora final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0. Después del intercambio de solución amortiguadora, la proteína concentrada se pasó a través de un filtro de 0.22 μ m en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se puso en muestra y probaron para concentración de proteínas, actividad de enzima, grupos sulfhidrilo libres, perfilado de oligosacárido y osmolaridad.

000239

La proteína de volumen filtrada estéril se dispensó asépticamente a 20 mL en viales de teflón de 30 mL estériles (Nalgene). Los viales se congelaron instantáneamente y almacenaron a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

F. Comparación de Producción y Purificación de rHuPH20 soluble en Gen1 y rHuPH20 soluble en Gen2

La producción y purificación de rHuPH20 soluble en Gen2 en un cultivo celular de bioreactor de 300L que contiene algunos cambios en los protocolos comparado con la producción y purificación de rHuPH20 soluble en Gen1 en un cultivo celular de bioreactor de 100 L. La Tabla 23 establece diferencias ejemplares, además de cambios de escala sencillos, entre los métodos.

Tabla 23. Comparación de métodos Gen1 y Gen2

Diferencias de proceso	rHuPH20 soluble en Gen1	rHuPH20 soluble en Gen2
Línea de célula	3D35M	2B2
Medio usado para expandir el inóculo celular	Contiene 0.10 μM metotrexato (0.045 mg/L)	Contiene 20 μM metotrexato (9 mg/L)
Medio en cultivos de 6 L hacia delante	Contiene 0.10 μM metotrexato	No contiene metotrexato
Matraz centrífugo 36 L	Sin instrumentación	Equipado con instrumentación que vigila y controla pH, oxígeno disuelto, relación de flujo de gas de recubierta y aspersión

000240

5	Volumen de operación final en bioreactor	Aproximadamente 100 L en un bioreactor de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	Aproximadamente 300 L en un bioreactor de 400 L (volumen de cultivo inicial + 260 L)
	Medio de cultivo en bioreactor final	Sin rHuInsulina	50 mg/L de rHuInsulina
	Volumen de medio de alimentación	Escalado a 4% del volumen de cultivo celular del bioreactor es decir 3.4, 3.5 y 3.7 L, que resulta en un volumen de bioreactor objetivo de ~92 L	Escalado a 4% del volumen de cultivo celular del bioreactor es decir 10.4, 10.8, 11.2 y 11.7 L, que resulta en un volumen de bioreactor objetivo de ~303 L
10	Medio de alimentación	Medio de alimentación #1: CD CHO + 50 g/L glucosa + 8mM GlutaMAX TM -1	Medio de alimentación #1: 4x CD CHO + 33 g/L glucosa + 32mM GlutaMAX TM -1 + 16.6 g/L yeastolato + 33 mg/L rHuInsulina
15		Medio de alimentación #2: (CD CHO + 50 g/L glucosa + 8mM GlutaMAX TM -1 + 1.1 g/L de butirato de sodio	Medio de alimentación #2: 2x CD CHO + 33 g/L glucosa + 16mM GlutaMAX TM -1 + 33.4 g/L de yeastolato + 0.92 g/L de butirato de sodio
20		Medio de alimentación #3: CD CHO + 50 g/L glucosa + 8mM GlutaMAX TM -1 + 1.1 g/L de butirato de sodio	Medio de alimentación #3: 1x CD CHO + 50 g/L glucosa + 10mM GlutaMAX TM -1 + 50 g/L de yeastolato + 1.80

		g/L de butirato de sodio Medio de alimentación #4: 1x CD CHO + 33 g/L glucosa + 6.6mM GlutaMAX™-1 + 50 g/L de yeastolato + 0.92 g/L de butirato de sodio
Filtración del cultivo celular de bioreactor	Cuatro filtros de poliétersulfona (8.0 µm, 0.65 µm, 0.22 µm y 0.22 µm) en serie	1ª fase - 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 fase - módulo sencillo que contiene una capa de tierra diatomácea graduada hasta 0.4-0.11 µm y una capa

	Bolsa de almacenamiento de 100 L	de tierra diatomácea graduada hasta <0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 3ª fase - filtro de poliestireno de 0.22 µm Bolsa de almacenamiento de 300 L Cultivo celular cosechado está complementado con EDTA 10 mM, Tris 10 mM hasta un pH de 7.5
	Intercambio de concentración y solución amortiguadora antes de la cromatografía	Concentrado con 2 TFF con filtro Millipore Spiral de poliétersulfona 30K MWCO Solución amortiguadora que intercambia el concentrado 6x con Hepes 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7.0 Bolsa de almacenamiento estéril de 20L
	Inactivación vírica antes de la cromatografía	Concentrado usando cuatro filtros Sartorius Sartoslice TFF 30K MWCO Solución amortiguadora que intercambia el concentrado 10x con Tris 10 mM, Na ₂ SO ₄ 20 mM, pH 7.5 Bolsa de almacenamiento estéril de 50 L
		Inactivación vírica realizada con la adición de Triton X-100 al 1%, tri-n-butyl fosfato 0.3%

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

Ejemplo 4

Determinación de Actividad de hialuronidasa de rHuPH20 soluble usando un Ensayo de Microturbidez

15 La actividad de hialuronidasa de PH20 humano recombinante soluble (rHuPH20) en muestras tales como cultivos celulares, fracciones de purificación y soluciones de purificación se determinó usando un ensayo turbidométrico, que se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une con la albúmina de suero. La actividad se mide al incubar rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) por 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 a 640 nm después de un periodo de desarrollo de 30 minutos. La reducción en la turbidez que resulta de la actividad de enzima en el sustrato de hialuronato de sodio es una medida de la actividad de hialuronidasa rHuPH20 soluble. El método se realiza usando una

20

000244

curva de calibración generada con diluciones de un ensayo rHuPH20 soluble trabajando un estándar de referencia, y se hacen las mediciones de actividad de muestra con relación a esta curva de calibración.

5 Se prepararon diluciones de la muestra en Soluciones de Diluyente de Enzima. Se preparó la Solución de Diluyente de Enzima (EDS) 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 Agua estéril para
10 irrigación (SWFI), y se diluye 0.2 mL de solución de albúmina de suero humana al 25% en la mezcla y se coloca en vórtice por 30 segundos. Esto se realizó dentro de 2 horas del uso y almacenamiento en hielo hasta que se necesita. Se diluyeron las muestras con EDS hasta un estimado de 1-2 U/mL. Generalmente, la
15 dilución máxima por etapa no excede 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución fue no menos de 20 μ L. Los volúmenes muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo fueron: Muestras en proceso, fracciones FPLC: 80 μ L; sobrenadantes de cultivo de tejido: 1 mL; material concentrado: 80
20 μ L; material de etapa purificado o final: 80 μ L. Se hicieron las diluciones por triplicado en una placa de 96 pozos de baja unión de proteína, y se transfirió 30 μ L de cada dilución a placas de fondo negro/transparente Optilux (BD Biosciences).

Las diluciones de rHuPH20 soluble conocida con una concentración de 2.5 U/mL se prepararon en solución diluyente de enzima para generar una curva estándar y se agrega a la placa Optilux por 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 con "reactivo en blanco" que contienen 60 μ L de la solución diluyente de enzima se incluyeron en la palca como un control negativo. Se cubrió entonces la placa y calentó en un bloque de calor por 5 minutos a 37°C. La cubierta se removió y la placa se agitó por 10 segundos. Después de agitación, la placa se regresó al bloque de calor y se imprimó el dispositivo de manejo de líquido MULTIDROP 384 con los 0.25 mg/mL de solución de hialuronato de sodio caliente (preparada al disolver 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical) en 20.0 mL de SWFI. Esto se examinó al girar y/o rodar suavemente a 2-8°C por 2-4 horas, o hasta que está completamente disuelto. La solución de sustrato se preparó al mezclar 9 mL de SWFI, 10 mL de PIPES y 1 mL de 5 mg/mL de hialuronato). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició al presionar la llave de inicio para despachar 30 μ L de solución de sustrato de hialuronato de sodio en cada pozo. La placa se removió entonces del MULTIDROP 384 y agitó por 10 segundos antes de transferirse al bloque de calor con la cubierta de placa reemplazada. Se incubó la placa a 37°C por 10 minutos.

Se preparó el MULTIDROP 384 para detener la reacción al cebar la máquina con solución de trabajo de suero (25 mL de solución madre de suero [se diluyó 1 volumen de suero de caballo (Sigma) con 9 volúmenes de solución amortiguadora de acetato 500 mM, pH 4.3, y se ajustó el pH hasta 3.1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de solución amortiguadora de acetato 500 mM, pH 4.3) y se cambia el volumen ajustando hasta 240 μ L. Se removió la placa del bloque de calor y se coloca en el MULTIDROP 384 y se despachó 240 μ L de la solución de trabajo de suero en los pozos. Se removió la

placa y agitó en el lector de placa por 10 segundos. Después de 15 minutos adicionales, se midió la turbidez de las muestras a 640 nm y la actividad de hialuronidasa (en U/mL) de cada muestra se determinó al ajustarse a la curva estándar.

- 5 Se calculó la actividad específica (Unidades/mg) al dividir la actividad de hialuronidasa (U/mL) por la concentración de proteínas (mg/mL).

Ejemplo 5

10 Efecto del Cloruro de Sodio en la Estabilidad de rHuPH20

La rHuPH20 estuvo en la solución a pH 6.5 que contiene 10 mg/mL en histidina/HCl y cloruro de sodio 130 mM (NaCl). Como se muestra en la Tabla 24, se prepararon un total de 6 formulaciones diferentes que contienen los siguientes componentes: Tris 25 mM, 15 pH 7.3, 100 µg/mL rHuPH20, Tween 80 al 0.01% y NaCl (0, 50, 100, 150, 200 o 250 mM). Las soluciones se colocaron en alícuotas en viales de vidrio tipo I de 2 mL con tapones de hule y sellados con tapas de aluminio. Se almacenó un conjunto de viales a 40 °C por cuatro días, y el otro conjunto se mantuvo en el refrigerador 20 a 2 hasta 8 °C.

Tabla 24. Formulación de rHuPH20 con NaCl

Formulación #	NaCl
1	0 mM
2	50 mM
3	100 mM
4	150 mM
5	200 mM
6	250 mM

000247

Después de 4 días de almacenamiento, cada una de las formulaciones mencionadas en la Tabla 24 se probó para actividad enzimática de hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. Se realizó la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) para evaluar el nivel de agregados usando las siguientes condiciones: 1X PBS, columna Toso Bioscience G2000 SWXL, relación de flujo = 1 mL/min.

La Tabla 25 muestra los resultados del estudio, incluyendo actividad de hialuronidasa (U/mL), % de área pico principal (porcentaje de la rHuPH20 que estuvo contenida en el área pico principal) y % de área pico agregada (porcentaje de rHuPH20 que estuvo contenida en el área pico atribuida a agregados) para cada formulación. Los resultados indican que la estabilidad de rHuPH20, cuando se incubaba a 40 °C, dependió de la concentración de NaCl: un incremento en la concentración de NaCl lleva a una actividad enzimática incrementada de rHuPH20. Las muestras almacenadas a 2 hasta 8 °C mantienen niveles similares de actividad enzimática rHuPH20 a través del curso del estudio, sin tener en cuenta la formulación. En ausencia de NaCl a temperaturas elevadas (40°C), se perdió la actividad enzimática entera de rHuPH20.

Los resultados en la Tabla 25 también muestran el efecto de la concentración de NaCl en los niveles de agregado de rHuPH20. Los niveles de agregado incrementan al reducir la concentración de NaCl en muestras almacenadas a 40°C. No hubo esencialmente cambio en las muestras almacenadas a 2 hasta 8 °C.

De esta manera, los resultados muestran que con el intervalo de concentración de NaCl probado (0-250 nM), hubo una relación

directa entre la concentración de NaCl y la estabilidad rHuPH20 incrementada, lo que sugiere que la concentración de NaCl se mantiene tan alta como sea posible dentro de los límites de solubilidad y tonicidad con objeto de incrementar la estabilidad de rHuPH20 a temperatura elevada.

Tabla 25. Actividades enzimáticas y resultados SEC de las muestras almacenadas 4 días a 40 °C y 28 °C.

Formulación	Actividad Enzimática		% de Pico Principal		% de Pico Agregado	
	2- 8 °C	40 °C	2-8 °C	40 °C	2-8 °C	40 °C
0 mM NaCl	10430	<LOD	99.40	0.00	0.60	100.00
50 mM NaCl	12370	3070	99.34	22.05	0.66	77.95
100 mM NaCl	12580	9930	99.47	72.81	0.53	27.19
150 mM NaCl	12750	11180	99.48	88.16	0.52	11.84
200 mM NaCl	13660	13340	99.64	96.22	0.36	3.78
250 mM NaCl	11370	11090	100.00	98.05	0.00	1.95

Ejemplo 6

Estabilidad de rHuPH20 co-formulada e IG

A. Estabilidad de IG al 10 % co-formulado o IG al 20 % con rHuPH20

Se formuló rHuPH20 como sigue: 1 mL que contiene 1048071 Unidades de hialuronidasa humana recombinante del lote HUB0702CA (generado usando producción de Gen2 descrita en el Ejemplo 3) en histidina 10 mM y cloruro de sodio 130 mM (NaCl) a pH 6.0. Se diluyó rHuPH20 hasta 100000 U/mL usando histidina 10 mM + NaCl 130 mM, pH 6.0, antes de mezclar con inmunoglobulina. Para este propósito, se diluyó 200 µL, de solución madre rHuPH20 con 1896 µL, de solución amortiguadora de histidina/NaCl, pH 6.0.

000249

Se agregó rHuPH20 pre-diluida a diferentes formulaciones IG formuladas en glicina 0.25 M a pH 4.4 hasta 4.9 para dar concentraciones finales de 100 U/mL o 300 U/mL en la solución. Uno de tres diferentes lotes de IG al 10% de la fabricación a gran escala (LE12H020, LE12H062, y LE12H173) o uno de los tres diferentes lotes de IG al 20% pre-clínicos (SC00107NG, SC00207NG, y SC00307NG) se utilizó de acuerdo a la Tabla 26. Se filtraron las soluciones a través de un filtro de 0.2 µm y se transfieren en porciones de 1 mL en viales de vidrio de 5 mL estériles. Los viales se almacenaron a 2 hasta 8°C o 28 hasta 32°C. Por lo tanto, las co-formulaciones resultantes de rHuPH20 e IG se formularon en glicina 0.25 M a pH 4.4 hasta 4.9.

Tabla 26. Co-formulaciones de rHuPH20 e IG al 10% o IG al 20%

Nombre de muestra	Cantidad de IG al 10% o IG al 20%	Cantidad de rHuPH20 diluida hasta 100000 U/mL
IG al 10%	50.00 mL	0
IG al 10% + 100 U/mL rHuPH20	49.95 mL	50 µL
IG al 10% + 300 U/mL rHuPH20	49.85 mL	150 µL
IG al 20%	50.00 mL	0
IG al 20% + 100 U/mL rHuPH20	49.95 mL	50 µL
IG al 20% + 300 U/mL rHuPH20	49.85 mL	150 µL

Después de 0 (inicio), 1, 3, 6, 12, 24 y 36 semanas (2 hasta 8 °C sólo) de almacenamiento, una muestra de cada una de las 6 formulaciones mencionadas en la Tabla 26 y de cada una de las cámaras de almacenamiento (2 hasta 8 °C y 28 hasta 32 °C) se retiró de la incubación y se analiza para actividad de hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. Para evaluar los efectos en IG, la distribución del tamaño molecular de la IG en formulaciones que contienen IG al 20

% se determinó a 0 (inicio) y 6 meses por cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7.5 mm (Tosoh Bioscience) y un sistema de solución amortiguadora que contiene DMSO (Kolarich et al. (2006) Transfusion, 46: 1959-1977).

La Tabla 27 muestra actividad de hialuronidasa (U/mL) a 7 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12, 24 y 36 semanas) para cada co-formulación almacenada a 2 hasta 8 °C. La Tabla 28 muestra actividad de hialuronidasa (U/mL) en 6 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12 y 2 semanas) para las co-formulaciones almacenadas a 28 hasta 32 °C. Una pérdida constante, importante de actividad de hialuronidasa se observó en presencia de co-formulaciones de IG al 10% y 20% almacenada a 28 hasta 32 °C después de 24 semanas, lo que indica inestabilidad de rHuPH20. Las co-formulaciones de IG al 10 % IG fueron estables después de 9 meses del almacenaje a 2 hasta 8 °C, aunque la actividad rHuPH20 se reduce ligeramente en las co-formulaciones de IG al 20%. La distribución de tamaño molecular del IG en formulaciones que contienen IG al 20 % se quedó sin cambio a ambas temperaturas después de 6 meses de almacenamiento (Tablas 29 y 30).

000251

Tabla 27. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones después del almacenaje a 2-8 °C

Muestra	Semanas						
	0 (inicio)	1	3	6	12	24	36
LE12H020+ 100 U/mL	99.2	95.4	97.3	101	93	92	98
LE12H020+ 300 U/mL	298.5	321.7	285.9	299	283	271	291
LE12H062+ 100 U/mL	108.5	97.5	99.6	103	99	92	102
LE12H062+ 300 U/mL	325	306.8	297.9	302	273	279	300
LE12H173+ 100 U/mL	103.1	95.9	97.3	107	98	99	106
LE12H173+ 300 U/mL	295.0	291.2	281.8	293	282	296	292
SC00107NG+ 100 U/mL	94.0	97.8	81.4	85	87	78	66
SC00107NG+ 300 U/mL	284.3	280.2	264.0	261	245	223	210
SC00207NG+ 100 U/mL	99.7	93.1	91.0	86	83	84	69
SC00207NG+ 300 U/mL	286	277	266.2	244	263	227	197
SC00307NG+ 100 U/mL	92.8	95.0	82.7	87	83	82	68
SC00307NG+ 300 U/mL	254.3	281.4	274.3	245	247	230	256

Tabla 28. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones después del almacenaje a 28-32 °C

Muestra	Semanas					
	0 (inicio)	1	3	6	12	24
LE12H020+ 100 U/mL	99.2	84.9	59.6	36	22	5
LE12H020+ 300 U/mL	298.5	259.3	185.4	104	57	19
LE12H062+ 100 U/mL	108.5	88.2	60.1	43	29	10
LE12H062+ 300 U/mL	325	266.2	185.6	129	76	28
LE12H173+ 100 U/mL	103.1	70.5	39.6	24	13	1
LE12H173+ 300 U/mL	295.0	210.1	122.0	60	31	9
SC00107NG+ 100 U/mL	94.0	83.1	57.4	43	49	32
SC00107NG+ 300 U/mL	284.3	242.2	182.0	124	148	96
SC00207NG+ 100 U/mL	99.7	84.5	61.1	46	51	35
SC00207NG+ 300 U/mL	286	251	198.1	131	145	106
SC00307NG+ 100 U/mL	92.8	82.7	67.9	48	52	34
SC00307NG+ 300 U/mL	254.3	253.6	209.7	140	157	106

Tabla 29. Distribución del tamaño molecular de IG en IG al 20 % co-formulada con rHuPH20 después del almacenaje a 2-8 °C

Muestra	0 (inicio)				6 semanas			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
SC00107NG	0.67	12.56	86.50	0.27	0.70	13.50	85.50	0.30
SC00107NG + 100 U/mL rHuPH20	0.62	12.39	86.75	0.24	0.70	13.59	85.43	0.28
SC00107NG + 300 U/mL rHuPH20	0.65	12.38	86.70	0.26	0.69	13.80	85.19	0.32
SC00207NG	0.73	13.25	85.76	0.26	0.86	14.52	84.34	0.28
SC00207NG + 100 U/mL rHuPH20	0.75	13.22	85.74	0.29	0.86	14.61	84.21	0.32
SC00207NG + 300 U/mL rHuPH20	0.77	13.39	85.63	0.21	0.83	14.57	84.30	0.30
SC00307NG	0.93	11.76	87.06	0.25	1.01	12.78	85.96	0.25
SC00307NG + 100 U/mL rHuPH20	0.96	11.91	86.94	0.20	1.03	13.04	85.62	0.31
SC00307NG + 300 U/mL rHuPH20	0.91	12.00	86.86	0.23	0.99	12.88	85.85	0.27

Tabla 30. Distribución del tamaño molecular de IG en IG al 20 % co-formulada con rHuPH20 después del almacenaje a 28-32 °C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
SC00107NG	0.67	12.56	86.50	0.27	0.50	12.53	85.94	1.02
SC00107NG + 100 U/mL rHuPH20	0.62	12.39	86.75	0.24	0.47	12.41	86.10	1.02
SC00107NG + 300 U/mL rHuPH20	0.65	12.38	86.70	0.26	0.52	12.41	85.97	1.09
SC00207NG	0.73	13.25	85.76	0.26	0.44	13.21	85.42	0.94
SC00207NG + 100 U/mL rHuPH20	0.75	13.22	85.74	0.29	0.42	13.15	85.52	0.91
SC00207NG + 300 U/mL rHuPH20	0.77	13.39	85.63	0.21	0.47	13.01	85.62	0.90
SC00307NG	0.93	11.76	87.06	0.25	0.47	11.91	86.78	0.84
SC00307NG + 100 U/mL rHuPH20	0.96	11.91	86.94	0.20	0.50	11.85	86.78	0.87
SC00307NG + 300 U/mL rHuPH20	0.91	12.00	86.86	0.23	0.40	11.50	87.21	0.89

B. Estabilidad de IG al 10% co-formulada con rHuPH20 y cloruro de sodio (0-150 mM)

Para mejorar la estabilidad de rHuPH20 en las co-formulaciones, se investigó el efecto de la adición de cloruro de sodio

sodio (NaCl). Se prepararon co-formulaciones de 300 U/mL de rHuPH20 (lote HUB0702CA; generadas usando producción de Gen2 descrito en el Ejemplo 3) en IG 10 % (lote LE12F047) como se describe en Ejemplo 7A arriba, con la adición de NaCl a 4 concentraciones diferentes (0, 50, 100 y 150 mM). Las co-formulaciones se almacenaron a 2 hasta 8 °C o 28 hasta 32 °C. De esta manera, las co-formulaciones resultantes de rHuPH20 e IG se formularon en glicina 0.25 M a pH 4.6 hasta 5.1 (como se mide en la solución diluida) en presencia de cantidades variadas de NaCl.

Después de 0 (inicio), 1, 3, 6, 12, 18 y 24 semanas de almacenamiento, una muestra de cada una de las co-formulaciones (con concentraciones de NaCl de 0, 50, 100, y 150 mM) y de cada una de las cámaras de almacenamiento (2 hasta 8 °C y 28 hasta 32 °C) se retiró de la incubación y se analiza para actividad de hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. La agregación de IG se determinó por distribución del tamaño molecular (MSD) por cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7.5mm y un sistema de solución amortiguadora que contiene DMSO (Kolarich et al. (2006) Transfusion, 46: 1 59-1977).

Las Tablas 31 y 32 muestran actividad de hialuronidasa (U/mL) en 7 puntos de tiempo (0, 1, 3, 6, 12, 18 y 24 semanas) para cada co-formulación. Los resultados muestran que la estabilidad de rHuPH20 co-formulada con IG al 10 % en presencia de NaCl 50, 100 o 150 mM se mantiene sin cambio por hasta 24 semanas de almacenaje a 2 hasta 8 °C, aunque la estabilidad de rHuPH20 se mejora para aquellas muestras almacenadas a 28 hasta 32 °C. Sin embargo, la actividad de hialuronidasa reduce

rápidamente en las co-formulaciones que tienen una concentración de NaCl de 0 mM cuando se almacena a 28 hasta 32 °C.

Las Tablas 33 y 34 muestran que NaCl aumenta ligeramente la dimerización de IG (~350 kDa) tanto en temperaturas de almacenamiento como agregación IG (>450 kDa) en 28 hasta 32 °C, y todos los valores se mantienen dentro de los límites de especificación MSD (>90 % monómero/dímeros, <5 % agregados, < 5% fragmentos) después de 6 meses.

Aunque la adición de NaCl impacta negativamente (incrementa) la titulación de actividad anticomplementaria (ACA) de formulaciones IG almacenadas a 28 hasta 32 °C, la titulación ACA es un indicador de especificación para administración intravenosa (IV) y relevante para administración subcutánea de las co-formulaciones.

Tabla 31. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones IG al 10%/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 2- 8 °C

Conc. de sal	(inicio) Semanas							
	0 (start)	1	2	3	6	12	18	24
0 mM NaCl	276	288	269	289	317	264	276	274
50 mM	292	286	296	306	320	287	276	295
100 mM	285	295	273	315	319	287	281	288
150 mM	294	280	301	305	327	294	277	298

Tabla 32. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones de IG al 10%/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32° C

Conc. de sal	Semanas							
	0 (inicio)	1	2	3	6	12	18	24
0 mM	276	232	237	216	201	121	109	81
50 mM	292	288	280	301	302	247	225	223
100 mM	285	286	280	292	315	277	253	258
150 mM	294	314	272	298	323	221	253	276

000255

Tabla 33. Distribución del tamaño molecular de IG en formulaciones de IG al 10%/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 2-8°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
0 mM NaCl	0.16	8.21	91.01	0.61	0.16	11.29	87.98	0.58
50 mM NaCl	0.17	8.99	90.24	0.60	0.22	12.54	86.62	0.62
100 mM NaCl	0.19	9.03	90.13	0.64	0.23	12.97	86.17	0.63
150 mM NaCl	0.19	9.08	90.13	0.61	0.24	12.93	86.30	0.53

Tabla 34. Distribución del tamaño molecular de IG en formulaciones de IG al 10%/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32°C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
0 mM NaCl	0.16	8.21	91.01	0.61	0.35	9.37	88.77	1.51
50 mM NaCl	0.17	8.99	90.24	0.60	0.75	10.83	86.85	1.57
100 mM NaCl	0.19	9.03	90.13	0.64	0.87	11.20	86.38	1.55
150 mM NaCl	0.19	9.08	90.13	0.61	1.02	11.15	86.18	1.66

C. Estabilidad de IG al 10 % o IG al 20 % co-formulados con rHuPH20 y Cloruro de sodio (0-50 mM)

Se investigó el efecto de la adición de cloruro de sodio a co-formulaciones de IG al 10 % o IG al 20 % con rHuPH20 almacenada a 28 hasta 32°C. Las co-formulaciones de 300 U/mL rHuPH20 (lote HUB0702CA; generadas usando producción de Gen2 descrito en el Ejemplo 1) en IG al 10 % (lote LE12F047) y 300 U/mL rHuPH20 (lote HUB0702CA; generadas usando producción de Gen2 descrito en el Ejemplo 1) en IG al 20 % (lote SC00108NG) se prepararon como se describe en Ejemplo 6B anterior, usando concentraciones de NaCl de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mM. De esta manera, las co-formulaciones resultantes de rHuPH20 e IG se formularon en glicina 0.25 M a pH 4.6 hasta 5.1 (como se mide en

000256

la solución diluida) en presencia de cantidades variadas de NaCl.

Después de 0 (inicio), 1, 3, 6, 12 y 24 semanas de almacenamiento una muestra de cada una de las co-formulaciones (con concentraciones de NaCl de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mM) se retiró de la incubación y se analiza para actividad de hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. La agregación IG se determinó por distribución del tamaño molecular por cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7.5 mm y un sistema amortiguador que contiene DMSO.

Las Tablas 35 y 36 muestran actividad de hialuronidasa (U/mL) en varios puntos de tiempo (0, 1, 3, 6 y 12 y 24 semanas) para cada co-formulación. Los resultados muestran que la estabilidad de rHuPH20 co-formulada con IG al 10% en presencia de concentraciones de NaCl más altas (20, 30, 40 y 50 mM) se mantienen relativamente sin cambio a través de 24 semanas de almacenaje a 28 hasta 32 °C. La actividad de hialuronidasa se reduce rápidamente en las co-formulaciones que tienen una concentración NaCl de menos de 20 mM cuando son almacenadas a 28 hasta 32 °C. La estabilidad de rHuPH20 co-formulada con IG al 20 % se mantiene relativamente sin cambio a través de 24 semanas de almacenaje a 28 hasta 32 °C en todas las concentraciones NaCl.

El cloruro de sodio aumenta ligeramente la dimerización de IG (~350 kDa) y agregación tanto en co-formulaciones de IG al 10 % como al 20% a 28 hasta 32 °C. El efecto es menos pronunciado en IG al 20 % (es decir, concentración de IG más alta) en agregación IG (Tablas 37 y 38).

000257

Tabla 35. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones de IG al 10 %/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32 °C

Concentración de Sal	Semanas					
	0	1	3	6	12	24
0 mM	292	260	225	211	135	<87
5 mM	294	247	242	225	162	<87
10 mM	272	255	242	240	177	91
20 mM	281	302	261	259	232	154
30 mM	279	273	256	261	229	180
40 mM	274	254	266	275	246	196
50 mM	275	254	278	281	252	200

Tabla 36. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones IG al 20 %/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32 °C

Concentración de Sal	Semanas					
	0	1	3	6	12	24
0 mM	267	264	251	238	212	138
5 mM	290	261	249	242	214	143
10 mM	276	264	262	232	207	141
20 mM	314	249	274	239	222	155
30 mM	252	253	276	241	211	162
40 mM	273	240	275	242	216	170
50 mM	289	238	266	234	232	165

Tabla 37. Distribución del tamaño molecular de IG en co-formulaciones de IG al 10 %/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32 °C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
0 mM NaCl	0.16	9.35	90.01	0.48	0.19	7.08	91.69	1.04
5 mM NaCl	0.16	9.53	89.71	0.60	0.21	7.66	91.11	1.02
10 mM NaCl	0.16	9.77	89.52	0.56	0.22	8.20	90.52	1.05
20 mM NaCl	0.17	9.96	89.27	0.60	0.26	8.42	90.27	1.05
30 mM NaCl	0.17	10.25	89.06	0.53	0.30	9.07	89.59	1.04
40 mM NaCl	0.17	10.48	88.82	0.53	0.34	9.06	89.56	1.05
50 mM NaCl	0.18	10.55	88.72	0.54	0.39	9.22	89.33	1.07

000258

Tabla 38. Distribución del tamaño molecular de IG en formulaciones de IG al 20 %/rHuPH20 con NaCl después del almacenaje a 28-32 °C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
0 mM NaCl	0.32	14.65	84.72	0.31	0.34	11.77	87.18	0.71
5 mM NaCl	0.32	14.70	84.70	0.27	0.34	11.57	87.35	0.74
10 mM NaCl	0.35	14.86	84.48	0.31	0.35	12.05	86.94	0.67
20 mM NaCl	0.30	14.95	84.48	0.27	0.37	12.17	86.76	0.69
30 mM NaCl	0.32	15.12	84.29	0.27	0.40	12.60	86.32	0.68
40 mM NaCl	0.32	14.92	84.48	0.27	0.47	12.68	86.16	0.69
50 mM NaCl	0.33	15.00	84.36	0.30	0.45	12.56	86.34	0.65

D. Estabilidad de rHuPH20 en Co-formulaciones con IG al 10% o IG al 20% IG en presencia de Cloruro de sodio (100-250 mM) o Aminoácidos (500 mM)

Se estudió el efecto en la estabilidad de rHuPH20 de co-formulaciones que contienen IG al 10% o IG al 20 % con rHuPH20 y cloruro de sodio o estabilizadores de aminoácidos. Las co-formulaciones de 100 U/mL o 300 U/mL rHuPH20 (lote HUB0702CA; generadas usando producción de Gen2 descrito en el Ejemplo 3) en IG al 10% (con glicina 0.25 M a pH 4.4) (lote LE12F047) o IG al 20 % (lote SC00108NG) se prepararon como se describe en Ejemplo 6A antes. Las muestras contienen ya sea NaCl (concentraciones de 100, 150 o 250 mM), glicina (500 mM) o prolina (500 mM). Las co-formulaciones se almacenaron a 2 hasta 8°C o 28 hasta 32 °C. De esta manera, las co-formulaciones resultantes de rHuPH20 e IG se formularon en glicina 0.25 M a pH 4.6 hasta 5.1 en presencia de cantidades variadas de NaCl, glicina o prolina.

000259

Después de 0 (inicio), 1, 2, 3, 6 y 12 (sólo 300 U/mL) semanas de almacenamiento, una muestra de cada una de las co-formulaciones (con concentraciones de NaCl ya sea de 100, 150 o 250 mM, concentración de glicina de 500 mM o concentración de prolina de 500 mM) se retiró de la incubación y se analiza para actividad de hialuronidasa usando el ensayo de microturbidez descrito en el Ejemplo 4. La agregación de IG se determinó por distribución del tamaño molecular a 0 (inicio) y 12 semanas por cromatografía de exclusión de tamaño de alto desempeño (HP-SEC) usando una columna TSK G 3000 SW 600 x 7.5 mm y un sistema de solución amortiguadora que contiene DMSO (Kolarich et al. (2006) Transfusion, 46: 1959-1977).

Las Tablas 39 y 41 muestran actividad de hialuronidasa (U/mL) en 5 puntos de tiempo (0, 1, 2, 3 y 6 semanas) para co-formulaciones que contienen 100 U/mL rHuPH20 e IG al 10% o 20%, respectivamente. Las Tablas 40 y 42 muestran actividad de hialuronidasa (U/mL) en 6 puntos de tiempo (0, 1, 2, 3, 6 y 12 semanas) para co-formulaciones que contienen 300 U/mL rHuPH20 e IG al 10% o 20%, respectivamente. Los resultados muestran que altas concentraciones de aminoácido (glicina 500 mM o prolina 500 mM) fueron menos efectivas que NaCl en estabilizar rHuPH20 en IG al 10 % o las co-formulaciones de IG al 20% con rHuPH20.

El cloruro de sodio, a todas las concentraciones estudiadas, aumenta la agregación de IG (>450 kDa) después del almacenaje a 28 hasta 32 °C en todas las co-formulaciones. Todas las co-formulaciones que contienen prolina 500 mM tienen un contenido de dímero IG reducido (~350 kDa) y un contenido de monómero incrementado (~160 kDa) después de 6 semanas de almacenaje a 28

hasta 32 °C. También se redujo el contenido de dímero IG en co-formulaciones con glicina, aunque no tan pronunciado como en las co-formulaciones de prolina (Tablas 43 y 44). Las altas concentraciones de prolina han probado que son efectivas para inhibir la agregación de proteína durante el replegado al bloquear efectivamente interacciones hidrofóbicas no específicas entre las proteínas (Kumar et al. (1998) Biochem. Mol. Biol. Int. 4:59- 517).

Tabla 39. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones IG al 10 % y 100 U/mL rHuPH20 con estabilizadores después del almacenaje a 28-32 °C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
100 mM NaCl	97	97	88	99	85	84
150 mM NaCl	99	91	102	93	94	85
250 mM NaCl	89	105	93	88	91	89
500 mM glicina	94	105	85	84	77	56
500 mM prolina	88	96	83	80	88	59

Tabla 40. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones IG al 10 % y 300 U/mL rHuPH20 con estabilizadores después del almacenaje a 28-32°C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
100 mM NaCl	294	303	284	266	260	233
150 mM NaCl	301	282	280	272	288	246
250 mM NaCl	280	290	275	278	255	250
500 mM glicina	254	296	246	256	229	194
500 mM prolina	242	304	266	244	226	204

000261

Tabla 41. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones de IG al 20 % y 100 U/mL rHuPH20 con estabilizadores después del almacenaje a 28-32 °C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
100 mM NaCl	268	313	262	256	223	214
150 mM NaCl	252	292	249	260	232	202
250 mM NaCl	262	302	270	254	236	213
500 mM glicina	285	286	291	244	221	191
500 mM prolina	308	303	242	248	230	197

Tabla 42. Actividad de hialuronidasa (U/mL) de co-formulaciones IG al 20% y 300 U/mL rHuPH20 con estabilizadores después del almacenaje a 28-32 °C

Concentración de estabilizador	Semanas					
	0 (inicio)	1	2	3	6	12
100 mM NaCl	268	266	264	226	237	255
150 mM NaCl	252	256	270	220	231	261
250 mM NaCl	262	243	273	246	243	273
500 mM glicina	285	257	289	211	230	267
500 mM prolina	308	257	268	231	229	259

000262

Tabla 43. Distribución del tamaño molecular de IG en co-
formulaciones de IG al 10 %/rHuPH20 con NaCl, glicina o prolina
después del almacenaje a 28-32 °C

Muestra	0 (inicio)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
10% IG + 100 U/mL rHuPH20 + 250 mM NaCl	0.15	10.92	88.35	0.59	0.50	9.58	89.13	0.80
10% IG + 300 U/mL rHuPH20 + 250 mM NaCl	0.14	11.05	88.27	0.54	0.46	9.59	89.11	0.84
10% IG + 100 U/mL rHuPH20 + 150 mM NaCl	0.14	11.07	88.15	0.65	0.45	9.71	88.97	0.87
10% IG + 300 U/mL rHuPH20 + 150 mM NaCl	0.14	11.42	87.82	0.62	0.45	9.76	89.09	0.70
10% IG + 100 U/mL rHuPH20 + 100 mM NaCl	0.18	11.29	87.91	0.63	0.38	9.36	89.53	0.74
10% IG + 300 U/mL rHuPH20 + 100 mM NaCl	0.13	11.43	87.89	0.55	0.38	9.32	89.52	0.78
10% IG + 100 U/mL rHuPH20 + 500 mM glicina	0.16	10.67	88.55	0.62	0.12	8.12	90.92	0.84
10% IG + 300 U/mL rHuPH20 + 100 mM glicina	0.16	10.80	88.43	0.61	0.16	8.17	90.95	0.73
10% IG + 100 U/mL rHuPH20 + 500 mM prolina	0.14	9.55	89.75	0.56	0.11	5.53	93.58	0.78
10% IG + 300 U/mL rHuPH20 + 100 mM prolina	0.14	9.43	89.86	0.57	0.12	5.65	93.52	0.71

Tabla 44. Distribución del tamaño molecular de IG en co-
formulaciones IG/rHuPH20 20% con NaCl, glicina o prolina después
del almacenado a 28-32°C

Muestras	0 (comienzo)				6 meses			
	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
IG 20%+100 U/mL rHuPH20 + 250 mM NaCl	0.25	15.03	84.28	0.44	0.48	12.55	86.37	0.60
IG 20%+300 U/mL rHuPH20 + 250 mM NaCl	0.26	15.12	84.16	0.46	0.51	12.53	86.36	0.59
IG 20%+100 U/mL rHuPH20 + 150 mM NaCl	0.26	15.32	83.97	0.45	0.45	12.74	86.12	0.69
IG 20%+300 U/mL rHuPH20 + 150 mM NaCl	0.25	15.21	84.08	0.46	0.47	12.78	86.13	0.61
IG 20%+100 U/mL rHuPH20 + 100 mM NaCl	0.24	15.40	83.87	0.50	0.43	12.69	86.24	0.65
IG 20%+300 U/mL rHuPH20 + 100 mM NaCl	0.25	15.53	83.81	0.42	0.48	12.72	86.17	0.63
IG 20%+100 U/mL rHuPH20 + 500 mM glicina	0.21	14.40	84.99	0.39	0.22	12.31	86.90	0.56
IG 20%+300 U/mL rHuPH20 + 100 mM glicina	0.21	14.38	85.00	0.41	0.22	12.47	86.73	0.58
IG 20%+100 U/mL rHuPH20 + 500 mM prolina	0.25	15.47	83.83	0.45	0.24	10.18	88.92	0.66
IG 20%+300 U/mL rHuPH20 + 100 mM prolina	0.25	15.72	83.54	0.49	0.24	10.35	88.81	0.61

Ejemplo 7

Efectos de rHuPH20 Co-formulado y IG 10% o IG 20% en Mini Cerdos
de Yucatán

A. Diseño Experimental

La factibilidad de dosificación de rHuPH20 co-formulado con
solución de inmunoglobulina (IG) 10% o 20% de (130 mM NaCl, 10mM
histidina, pH 6.6) subcutáneamente en Mini Cerdos de Yucatán se
determinó y comparó con dosificación de Ventaja Comparativa

000264

(dosificación sucesiva de rHuPH20 seguido por solución IG). Una respuesta de dosis que utiliza diversas concentraciones de rHuPH20 también se evaluó por cada solución IG.

Dieciocho Mini Cerdos de Yucatán machos que pesan 18.4 - 23.2 kg (SNS Farms) se asignaron a uno o dos de once grupos de tratamiento como se muestra en la Tabla 45 de manera que cada grupo utiliza tres cerdos. Todas las formulaciones se administraron subcutáneamente con agujas Huber dobladas a 90 grados suaves de calibre 10 en las espaldas de cerdos machos anestesiados. Para dosificación de Ventaja Comparativa, rHuPH20 seguido por IgG se inyectó consecutivamente usando la misma aguja en la ubicación exacta, empleando un conmutador de jeringa simple. Ningún retardo entre dosificación rHuPH20 e IgG se requirió o empleó. Por hasta dos diferentes formulaciones, cada uno de un diferente grupo de tratamiento, se probaron en cada cerdo en un volumen máximo de 110 mL por sitio de inyección. Las infusiones duraron aproximadamente 20 minutos por co-formulaciones y 22-28 minutos por formulaciones de Ventaja Comparativa.

Tabla 45. Sumario de diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Tipo de Dosis	Volumen de Dosis Total (mL)
1	100 mL IG 10%	Co-formulación	100
2	100 mL IG 10% / rHuPH20 (50 U/mL)	Co-formulación	100
3	100 mL IG 10% / rHuPH20 (100 U/mL)	Co-formulación	100
4	100 mL IG 10% / rHuPH20 (300 U/mL)	Co-formulación	100
5	50 mL IG 20%	Co-formulación	50
6	50 mL IG 20% / rHuPH20 (50 U/mL)	Co-formulación	50
7	50 mL IG 20% / rHuPH20 (100 U/mL)	Co-formulación	50
8	50 mL IG 20% / rHuPH20 (300 U/mL)	Co-formulación	50
9	10 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 100 mL IG 10%	Ventaja Comparativa	110
10	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	Ventaja Comparativa	60
11	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	Ventaja Comparativa	70

000265

Las observaciones del sitio de inyección se evaluaron después de la dosificación. Los transductores se utilizaron para medir la presión continua (mmHg) ejercida para administrar cada formulación, y se colectó sangre por Conteo Sanguíneo Completo (CBC) y análisis de inmunoglobulina gamma (IgG). En la terminación del estudio, 3 días posterior a la dosificación, todos los animales se sacrificaron y dos secciones de muestra (A y B) se colectaron de cada uno del Sitio de Inyección 1, Sitio de Inyección 2, y Control (colectado de un sitio distante de los dos sitios de inyección) y conservaron en formalina amortiguada neutral 10%, y evaluaron por microscopía de luz (Nova Pathology, PC, San Diego, CA). El sitio A fue una sección gruesa 2-3 mm a través del centro del sitio de inyección y Sitio B fue una sección gruesa 2-3 mm tomada del final del sitio de inyección cosechado.

B. Observaciones del Sitio de Inyección

Dentro de 5 minutos de dosificación IG 10% solo (~ 25 mL en la infusión; Grupo 1), una 'burbuja' distinta fue visible en todos los tres cerdos. Aproximadamente 10 minutos en la dosificación IG 20% solo (~ 25 mL en la infusión; Grupo 5), una burbuja distinta fue visible. El área de formación de burbuja observada incrementada con todas las formulaciones que contienen rHuPH20 (incluyendo Ventaja Comparativa) comparada con dosificación IG solamente, significa mayor dispersión de fluidos cuando se utiliza rHuPH20 (Tabla 46).

Las co-formulaciones de rHuPH20 con 10% y 20% de IG resultaron en un endurecimiento significativamente reducido de la

000266

piel en todas las concentraciones de rHuPH20 (los sitios permanecieron suaves), y redujeron el color rosa/enrojecimiento de la piel en todas las concentraciones de rHuPH20. La dosificación de comparación de la Ventaja Comparativa resulta en 5 observaciones de rosa/enrojecimiento similares como co-formulaciones. Las ocurrencias de rosa/enrojecimiento en los sitios de inyección observadas posterior a la dosificación muestran recuperación completa dentro de 24 horas para todos los grupos (Tabla 46).

Tabla 46. Apariencia y análisis de sitio de inyección

Grupo	Tratamiento	Área de Burbuja Media (cm²)	Observación de Burbuja Media
1	100 mL IG 10%	97.5	Ligeramente rosa; Duro
2	100 mL IG 10% / rHuPH20 (50 U/mL)	91.7	Ligeramente rosa; Suave
3	100 mL IG 10% / rHuPH20 (100 U/mL)	180.3	Ligeramente rosa/rosa Suave
4	100 mL IG 10% / rHuPH20 (300 U/mL)	178.0	Ligeramente rosa/rosa Suave
5	50 mL IG 20%	95.2	Rosa/rojo; Duro
6	50 mL IG 20% / rHuPH20 (50 U/mL)	102.6	Rosa/rojo; Suave
7	50 mL IG 20% / rHuPH20 (100 U/mL)	111.9	Ligeramente rosa/rosa Suave
8	50 mL IG 20% / rHuPH20 (300 U/mL)	111.1	Normal; Suave
9	10 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 100 mL IG 10%	173.5	Normal; Suave
10	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	116.8	Normal/ Ligeramente rosa; Suave
11	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	131.4	Normal/ Ligeramente rosa; Suave

C. Observaciones de Medición de Presión

La Tabla 47 resume las mediciones de presión media. En 2.5 minutos o antes de la dosificación posterior IG 20% solamente (Grupo 5), las presiones estaban fuera del intervalo de medición (>460 mmHg) para todos los tres cerdos. Dos de los tres cerdos estaban fuera del intervalo de presión medible en Grupo 6, y un

cerdo estaba fuera del intervalo por cada uno de los Grupos 7 y 8. Los Grupos 1 y 2 cada uno tienen un cerdo fuera del intervalo. Los resultados muestran que la presión necesaria para lograr las inyecciones disminuyó con todas las co-formulaciones que contiene rHuPH20.

Tabla 47. Análisis de medición de presión media

Grupo	N	Presión Media (mmHg)	Aumento de Presión máxima (mmHg)	Presión Máxima (mmHg)	Aumento de Tiempo máximo (min)	Tiempo Máximo (min)
1	2	242	266	281	2.7	5.1
2	2	209	N/A*	223	N/A*	4.0
3	3	164	0.3	223	0.3	4.1
4	3	289	0.5	255	0.5	2.3
5	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	1	164	250	250	1.6	1.6
7	2	179	215	215	0.7	0.7
8	2	194	188	203	1.6	4.6
9	3	117	119	125	1.9	4.9
10	3	241	232	261	3.8	12.9
11	3	241	281	264	4.7	15.2

N/A = No Disponible, >460 mmHg

N/A* = Curva creciente de grabación de presión no claro para interpretar

D. Conteo Sanguíneo Completo y Análisis de Plasma IgG

La sangre se colectó en tubos K3EDTA en pre-dosis (~2.0 mL) y en 30 minutos posterior a la dosificación (~2.0 mL) por análisis de Conteo Sanguíneo Completo (CBC). Las muestras se almacenaron a 4°C hasta el análisis (Bioquant, Inc., San Diego, CA). Los resultados de CBC no se dan por cualquier producto relacionado con la seguridad específica que preocupa. La mayoría de los cerdos permaneció dentro de los niveles normales de CBC (intervalo normal de CBC referido de las granjas SNS). Cinco de los dieciocho cerdos tuvieron coágulos no visibles en las muestras y no se

000268

pudieron evaluar.

La sangre para análisis de inmunoglobulina gamma (IgG) se colectó en tubos de Citrato de Sodio en pre-dosis (~2.0 mL) y en la terminación del estudio (~4.0 mL) para 5 confirmar la disponibilidad sistémica después de la administración subcutánea de IgG humano. Las muestras se centrifugaron en 4°C por 10 minutos en 3000 rpm, plasma se dividió en alícuotas, y las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Un incremento general en IgG se observó 10 en todos los animales 3 días después de la administración, como se muestra en la Tabla 48. Los niveles de plasma IgG para cada cerdo refleja la media de los dos diferentes tratamientos que se administró a cada cerdo (con la excepción de cerdos 7-9 que recibieron un tratamiento 15 simple únicamente).

Tabla 48. Análisis IgG

Cerdo #	Grupos de Tratamiento	IgG (g/L)	
		Predosis	Terminación
1	1 y 2	3.46	8.53
2	1 y 2	2.97	9.27
3	1 y 2	4.35	9.03
4	3 y 4	6.67	10.51
5	3 y 4	3.81	10.15
6	3 y 4	4.79	9.83
7	5	4.96	6.06
8	5	3.50	5.94
9	5	3.73	6.86
10	6 y 7	2.83	8.19
11	6 y 7	3.47	10.08
12	6 y 7	4.08	11.12
13	8 y 9	5.07	9.62
14	8 y 9	4.02	8.82
15	8 y 9	3.94	8.63
16	10 y 11	3.97	9.25
17	10 y 11	4.60	9.68
18	10 y 11	4.76	9.51

000060

E. Resultados de Histopatología

Los hallazgos histológicos estuvieron presentes en la epidermis, dermis y tejido subcutáneo, y contenían una inflamación mixta de leucocitos, edema y hemorragia. A Cada hallazgo histológico se le asignó un grado de severidad con base en el esquema siguiente:

No Presente: 0; Presente, No Clasificado: 0; Mínimo: 1; Leve: 2; Moderado: 3; Marcado:

Hallazgos histológicos se resumen por la incidencia y severidad media del grupo registrado en las Tablas 49-51.

Tabla 49. Sumario de hallazgos histológicos: IG 10% + rHuPH20

Hallazgos Histológicos	Grupo de Tratamiento			
	1	2	3	4
Inflamación, Leucocitos Mezclados, subcutáneos	6/6*	6/6	5/6	6/6
Registro de Severidad Media del Grupo**	1.83	1.00	1.00	1.17
Edema, subcutáneos	6/6	5/6	6/6	5/6
Registro de Severidad Media del Grupo	2.00	0.83	1.00	1.17
Hemorragia, subcutáneos	3/6	3/6	2/6	1/6
Registro de Severidad Media del Grupo	0.67	0.50	0.33	0.33
Suma de Registros de Severidad Media del Grupo	4.50	2.33	2.33	2.67

* Número de Secciones Afectadas / Número de Secciones Evaluadas

** Suma de registros de severidad en el grupo dividido por el número de secciones evaluadas en el grupo

Tabla 50. Sumario de hallazgos histológicos: IG al 20% + rHuPH20

Hallazgos histológicos	Grupo de tratamiento			
	5	6	7	8
Inflamación, leucocito mezclado, subcutáneo	6/6 *	6/ 6	5/6	6/ 6
Registro de Severidad del Grupo	1.0	1.	1.0	2.
Medio**	0	17	0	17
Edema, subcutáneo	6/6	6/ 6	5/6	5/ 6
Registro de Severidad del Grupo	1.1	1.	1.1	2.
Medio	7	17	7	00
Hemorragia, subcutáneo	0/6	2/ 6	0/6	1/ 6
Registro de Severidad del Grupo	0.0	0.	0.0	0.
Medio	0	33	0	17
Suma de Registros de Severidad del Grupo	2.1	2.	2.1	4.
Medio	7	67	7	34

*Número de secciones Afectadas / Número de sección evaluadas

**Suma de registros de severidad en el grupo dividido por el número de secciones evaluadas en el grupo

000271

Tabla 51. Sumario de hallazgos histológicos: dosificación límite líder

	Hallazgos histológicos	Grupo de tratamiento			
		5	6	7	8
5	Inflamación, leucocito mezclado, subcutáneo	6/6 *	6/ 6	5/6	6/ 6
	Registro de Severidad del Grupo	1.0	1.	1.0	2.
	Medio**	0	17	0	17
10	Edema, subcutáneo	6/6	6/ 6	5/6	5/ 6
	Registro de Severidad del Grupo	1.1	1.	1.1	2.
	Medio	7	17	7	00
	Hemorragia, subcutáneo	0/6	2/ 6	0/6	1/ 6
15	Registro de Severidad del Grupo	0.0	0.	0.0	0.
	Medio	0	33	0	17
	Suma de Registros de Severidad del Grupo Medio	2.1 7	2. 67	2.1 7	4. 34

* Número de Secciones Afectadas / Número de Secciones Evaluadas

** Suma de registros de severidad en el grupo dividido por el número de secciones evaluadas en el grupo

La respuesta de la administración de IG y rHuPH20 fue cualitativamente similar en cada grupo de dosis en este estudio. Estas respuestas se caracterizaron por inflamación mixta de leucocitos, edema y hemorragia en el tejido subcutáneo en los sitios de inyección. La Tabla 52 compara el registro de severidad media del grupo en todos de los grupos de dosis.

Tabla 52. Sumario de registros de severidad media del grupo

Grupo	Tratamiento	Tipo de Dosis	Suma de Registros de Severidad Media del Grupo
1	100 mL IG 10%	Co-formulación	4.50
2	100 mL IG 10% / rHuPH20 (50 U/mL)	Co-formulación	2.33
3	100 mL IG 10% / rHuPH20 (100 U/mL)	Co-formulación	2.33
4	100 mL IG 10% / rHuPH20 (300 U/mL)	Co-formulación	2.67
5	50 mL IG 20%	Co-formulación	2.17
6	50 mL IG 20% / rHuPH20 (50 U/mL)	Co-formulación	2.67
7	50 mL IG 20% / rHuPH20 (100 U/mL)	Co-formulación	2.17
8	50 mL IG 20% / rHuPH20 (300 U/mL)	Co-formulación	4.34
9	10 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 100 mL IG 10%	Ventaja Comparativa	2.84
10	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	Ventaja Comparativa	3.51
11	20 mL rHuPH20 (150 U/mL) + 50 mL IG 20%	Ventaja Comparativa	3.17

Con base en los registros de severidad media del grupo, las respuestas más severas en el sitio de inyección se asociaron con la administración de 100 mL de 10% de IG sola (Grupo 1) y con la administración de 50 mL de 20% de IG co-formulada con 300 U/mL de rHuPH20 (Grupo 8). La respuesta a la administración de 100 mL de IG 10% co-formulado con rHuPH20 en 50, 100 y 300 U/mL de IG 10% (Grupos 2-4) fue similar a la respuesta a la administración de 50 mL de IG 20% IG solo (Grupo 5), co-formulado con rHuPH20 en 50 y 100 U/mL de IG 20% (Grupos 6 y 7), y dosificación de Ventaja Comparativa con 10 mL de rHuPH20 (150 U/mL) seguido por 100 mL de IG 10% (Grupo 9). Sin embargo, la dosificación de Ventaja Comparativa con 10 o 20 mL de rHuPH20 (150 U/mL) seguido por 50 mL de IG 20% (Grupos 10 y 11) resultó en una respuesta más severa que hizo co-formulaciones similares (Grupos 6 y 7). Las secciones de piel de control contenían pocos hallazgos histológicos, que se pueden atribuir a la difusión de las formulaciones inyectadas de los sitios de inyección de artículo de prueba, y hallazgos incidentales no relacionados a las formulaciones.

000273

F. Sumario

Los resultados confirmaron la factibilidad de dosificación rHuPH20 co-formulado con IG 10% y 20% subcutáneamente en Mini Cerdos de Yucatán. IG (10% o 20%) administrado solo es factible, a pesar de un resultado de grado moderado a severo de endurecimiento y rosa/enrojecimiento de la piel. Las co-formulaciones con rHuPH20 resultaron en una disminución en presión necesaria para lograr las inyecciones, significativamente el endurecimiento reducido de la piel, y rosa/enrojecimiento reducido de la piel. El área de formación de burbuja observada fue similar o incrementó con todas las formulaciones que contenían rHuPH20 comparado con dosificación de IG solamente, confirmando mayor dispersión de fluidos cuando rHuPH20 se utilizó. La dosificación de Ventaja Comparativa fue factible, y se observaron presión similar, rosa/enrojecimiento y áreas de burbuja como con co-formulaciones. Los hallazgos histopatológicos presentes en el tejido subcutáneo profundo atribuido a la dosificación incluyó inflamación mixta de leucocitos, edema y hemorragia, con las respuestas más severas asociadas con la administración de 10% de IG sola y 20% de IG co-formulada con rHuPH20 (300 U/mL).

Ya que serán evidentes las modificaciones para aquellos expertos en la técnica. Se pretende que esta invención se limite solamente por el alcance de las reivindicaciones anexas.

000274

NOVEDAD DE LA INVENCION

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

10

15

20

000275

REIVINDICACIONES

1. Una composición en co-formulación líquida estable, formulada para administración subcutánea, en donde la composición
5 tiene un pH de entre 4 o cerca de 4, hasta entre 5 o cerca de 5, inclusive, y comprende:

Inmunoglobulina (IG) en una concentración que es al menos 10 % p/v;

Una hialuronidasa soluble en una concentración que es al
10 menos 50 U/mL y está presente en una cantidad suficiente para permitir la administración subcutánea de la composición en un sitio de inyección único, a una tasa de infusión igual a, o mayor que, la tasa de infusión intravenosa para la inmunoglobulina intravenosa; y

15 Una sal cloruro de metal alcalino en una concentración de al menos 0.05 M, por lo que la co-formulación es estable a temperaturas hasta de 32° C por al menos 6 meses.

2. Una composición en co-formulación líquida estable,
20 formulada para administración subcutánea, en donde la composición tiene un pH de entre 4 o cerca de 4, hasta entre 5 o cerca de 5, inclusive, y comprende:

Inmunoglobulina (IG) en una concentración que es al menos 10 % p/v;

Una hialuronidasa soluble en una concentración que es al menos 50 U/mL y está presente en una relación de al menos 100 Unidades/gramo (U/g) de IG; y una sal cloruro de metal alcalino en una concentración de al menos 0.05 M, por lo que la co-

000276

formulación es estable a temperaturas hasta de 32 °C por lo menos 6 meses.

3. La co-formulación líquida estable la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un estabilizador de aminoácido en una cantidad que es al menos 0.1 M.

4. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 3, en donde el estabilizador de aminoácido se selecciona de alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina.

5. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el estabilizador de aminoácido es glicina o prolina.

6. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el estabilizador de aminoácido está en una cantidad que es, o es al menos 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.25M, 0.3M, 0.35M, 0.4M, 0.45 M, 0.5 M 0.6 M, 0.7M o 0.75M.

7. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el estabilizador de aminoácido está en una cantidad que es 0.25M.

8. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la IG está en al menos 10% p/v, 11% p/v, 12% p/v, 13% p/v, 14% p/v, 15% p/v, 16% p/v, 17% p/v, 18% p/v, 19% p/v, 20% p/v, 21% p/v, 22% p/v o más.

000277

9. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la IG está en, o cerca de 10% p/v hasta, o cerca de 20% p/v

5

10. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la IG es de plasma humano.

10 11. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la IG se purifica de plasma humano por un método de purificación que comprende fraccionamiento con alcohol.

15 12. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la IG además se purifica por uno o más de: precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía por intercambio iónico, ruptura enzimática, diafiltración o ultrafiltración.

20 13. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde La IG se somete a una etapa de reducción viral seleccionada de incubación a pH 4.0 con o sin pepsina, tratamiento con detergente solvente y nanofiltración.

14. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la IG contiene IgG, IgA e IgM.

15. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las

000278

reivindicaciones 1-14, en donde la IG contiene más del 95% de IgG.

16. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
5 reivindicaciones 1-15, en donde la sal cloruro de metal alcalino se selecciona entre KCl y NaCl.

17. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
reivindicaciones 1-16, en donde la sal cloruro de metal alcalino
10 es NaCl y el NaCl está en una concentración de 0.025M, 0.03M, 0.04M, 0.05M, 0.08M, 0.09M, 0.1M, 0.15M, 0.2M o 0.25M.

18. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
reivindicaciones 1-17, en donde el NaCl está en una concentración
15 de 0.15M.

19. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
reivindicaciones 1-18, en donde la hialuronidasa soluble es
PH20 o una forma truncada de ésta.

20

20. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
reivindicaciones 1-19 en donde la PH20 se selecciona de una PH20
ovina, bovina o humana truncada.

21. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las
reivindicaciones 1-20, en donde la PH20 es una PH20 humana
truncada y la PH20 humana truncada se selecciona de polipéptidos
que tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera

000279

de SEQ ID NOS:4-9, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas.

22. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde la hialuronidasa soluble se designa como rHuPH20.

23. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la hialuronidasa soluble está en una concentración de 50U/mL, 100 U/mL, 200 U/mL 300 U/mL 400 U/mL, 500 U/mL, o más.

24. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la hialuronidasa soluble está en una concentración que es de, o cerca de 75 U/mL hasta de, o cerca de 350 U/mL.

25. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde la hialuronidasa soluble está en una relación de 100 U/g de IG, 150 U/g de IG, 200 U/g de IG, 250 U/g de IG, 300 U/g de IG, 400 U/g de IG, 500 U/g de IG 600 U/g de IG, 700 U/g de IG, 800 U/g de IG, 900 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1200 U/g de IG, 1500 U/g de IG, 1800 U/g de IG, 2000 U/g de IG, 3000 U/g de IG, 4000 U/g de IG o 5000 U/g IG.

26. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la hialuronidasa soluble está en una relación de 250 U/g, 500 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1500 U/g

000280

de IG o 3000 U/g de IG.

27. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que tiene un pH de 4.4 a 4.9 en forma concentrada.

28. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde la co-formulación es para administración por dosificación múltiple.

29. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 en donde la co-formulación es para administración por dosificación única.

30. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y la reivindicación 29 en donde la IG está en una cantidad suficiente para administración por dosificación única para tratar una enfermedad o condición tratable con IG.

31. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 29-30, en donde la cantidad de IG es una cantidad suficiente para administración por dosificación única diariamente, semanalmente, cada dos semanas, cada 2-3 semanas, cada 3-4 semanas o mensualmente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

32. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde la cantidad de IG en la co-

000281

formulación es sustancialmente la misma que la cantidad en una administración por dosificación única cuando se administra intravenosamente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

5

33. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde la co-formulación es para administración por dosificación única y la cantidad de IG es de, o cerca de, o al menos de 1 gramo (g), 2g, 3g, 4g, 5g, 10g, 20g, 30g, 40g, 50g, 60g, 70g, 80g, 90 g, 100g o 200 g o es de, o cerca de 1-200, 1-100, 10-100, 5-50, 6-50, 5-100g.

34. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde la co-formulación es para administración por dosificación única y la cantidad de hialuronidasa en la composición es de, o cerca de, o al menos de 500 Unidades, 1000 Unidades, 2000 Unidades, 5000 Unidades, 10000 Unidades, 30000 Unidades, 40000 Unidades, 50000 Unidades, 60000 Unidades, 70000 Unidades, 80000 Unidades, 90000 Unidades, 100000 Unidades o más.

35. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, que es estable entre 28°C - 32°C por seis meses, 7 meses, 8 meses, 9, meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más.

36. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-35, que además es estable entre 0°C-10 °C

000282

por 6 meses, 1 año, 2 años o más.

37. Un kit, que comprende la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y opcionalmente instrucciones para el uso.

38. Un contenedor, que comprende la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36.

39. Un contenedor de la reivindicación 38 que es un tubo, un frasco o un vial.

40. Un contenedor de la reivindicación 38 que es una jeringa.

41. Un contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-40, que además comprende una aguja para inyección.

42. El contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-41, en donde se suministra la co-formulación líquida estable para administración por dosificación única o administración por dosificación múltiple.

43. Un kit que comprende el contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-42, y un medio para la infusión de la composición.

44. Un método de tratamiento de una enfermedad o

000283

condición tratables con IG, que comprende administrar subcutáneamente a un individuo, la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36.

5

45. El método de la reivindicación 44, en donde la co-formulación se administra de tal manera que la cantidad de IG administrada es sustancialmente la misma que la cantidad cuando se administra intravenosamente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

10

46. El método de las reivindicaciones 44-45, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona de enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades auto-inmunes e infecciones agudas.

15

20 47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad de inmunodeficiencia primaria y la enfermedad de inmunodeficiencia primaria se selecciona entre inmunodeficiencia variable común (CVID), deficiencia selectiva de IgA, deficiencia de la subclase IgG, deficiencia de anticuerpos específicos, desordenes de complemento, agammaglobulinemia congénita, ataxia telangiectasia, hiper-IgM, síndrome

000284

de Wiskott-Aldrich, inmuodeficiencia severa combinada (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmuodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agammglobulinemia unida a X (XLA) e hipogammaglobulinemia de la infancia.

48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad de inmuodeficiencia adquirida secundaria a malignidades hematológicas y la malignidad hematológica se selecciona entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de no-Hodgkins (NHL).

49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-48, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad inflamatoria o autoinmune y la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona entre la enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain Barre, púrpura trombocitopénica idiopática, polimiositis, dermatomiositis, miositis de inclusión de cuerpo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuropatía motora multifocal, miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltman.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-49, donde la condición o enfermedad tratable con IG es

000285

una infección aguda bacteriana, viral o por hongos, y la infección aguda bacteriana, viral o por hongos se selecciona entre *Haemophilus influenzae* tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; streptococcus grupo B; *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23; adenovirus tipos 2 y 5; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr VCA; virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus 1 del herpes simple, virus 2 del herpes simple; influenza A; sarampión; parainfluenza tipos 1,2 y 3; polio; virus zoster de la varicela; *Aspergillus*; y *Candida albicans*.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-50, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre inmunodeficiencia iatrogénica; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica ANCA-POSITIVA; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bulosa, penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica autoinmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia aloinmune feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células del tallo hematopoyético alogénico de alto riesgo, neuropatía paraproteinémica de IgM, trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica, opsclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de

Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de shock tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; degeneración cerebelar paraneoplastica sin anticuerpos; y trasplante de la médula ósea.

52. Uso de la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para la formulación de un medicamento para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

53. El uso de la reivindicación 52, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes e infecciones agudas.

54. Una co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para uso en el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

55. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 54, donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes e infecciones agudas.

000287

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Baxter International, Inc.
 Baxter Healthcare, S.A.
 Teschner, Wolfgang
 Svatos, Sonja
 Bruckschwaiger, Leopold
 Weber, Alfred
 Schwarz, Hans-Peter
 Lei, Laura

<120> CO-FORMULACIÓN ESTABLE DE HIALURONIDASA E INMUNOGLOBULINA, Y MÉTODOS DE SU USO

<130> 3800020-00137/3088PC

<140> Aún no asignado

<141> Con esto

<150> US 61/277,045

<151> 2009-09-17

<160> 56

<170> FastSEQ por Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> PH20 humano precursor

<400> 1

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

000288

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

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

<220>
 <223> PH20 maduro

<400> 2

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

000289


```

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

```

<210> 3

<211> 482

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble precursor

<400> 3

```

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

```

000290

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

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-447

<400> 4
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110
 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val

. 000291

	115		120		125										
Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Val	Gln	Leu
	130					135				140					
Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe	Glu	Lys	Ala
145					150					155					160
Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg
			165						170					175	
Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His
		180						185					190		
His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ile
	195						200					205			
Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu
	210					215					220				
Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Thr
225					230					235					240
Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Ser	Lys	Ile
			245						250					255	

Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ile	Val
		260						265					270		
Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Val	Tyr
		275					280					285			
Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Val	Ile	Trp
	290					295					300				
Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Asp
305					310					315					320
Asn	Tyr	Met	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Ile	Asn	Val	Thr	Leu
			325					330						335	
Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Gln	Gly	Val	Cys
		340						345					350		
Ile	Arg	Lys	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Leu	Asn	Pro	Asp
	355					360						365			
Asn	Phe	Ala	Ile	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Gly
	370					375					380				
Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Ser	Glu	Lys	Phe	Tyr	Cys
385					390					395					400
Ser	Cys	Tyr	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	Val	Lys	Asp
			405					410						415	
Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Asp	Gly	Val	Cys	Ile	Asp	Ala
		420						425					430		
Phe	Leu	Lys	Pro	Pro	Met	Glu	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Ile	Phe	Tyr	
		435					440					445			

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-446

<400> 5

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

000292

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

<210> 6

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-445

<400> 6

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

000293

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

<210> 7

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-444

<400> 7

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

000294

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

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

<220>
 <223> rHuPH20 soluble 1-443

<400> 8
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110

000295

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

 Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
 385 390 395 400
 Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
 405 410 415
 Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420 425 430
 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
 435 440

<210> 9

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> rHuPH20 soluble 1-442

<400> 9

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

000296

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

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

<220>
<223> hialuronidasa

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

000297

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

```
<210> 11
<211> 553
<212> PRT
<213> Bos taurus
```

<220>
<223> PH20

<400> 11															
Met	Arg	Met	Leu	Arg	Arg	His	His	Ile	Ser	Phe	Arg	Ser	Phe	Ala	Gly
1				5					10					15	
Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Pro	Cys
			20					25					30		
Cys	Leu	Ala	Leu	Asp	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Ser
		35					40					45			
Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Val	Glu	Arg	Cys	Val	Asn	Arg	Arg
	50					55					60				
Phe	Gln	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Val	Lys	Gly	Ser	Pro
65					70					75					80
Gln	Lys	Ser	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Phe	Tyr	Ala	Asp	Arg

000292

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

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

 <220>

000299

<223> hialuronidasa A

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 340

<212> PRT

<213> *Vespula vulgaris*

<220>

<223> hialuronidasa B

<400> 13

```

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

```

000300

[illegible]

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

```
<220>  
<223> hialuronidasa  
<400> 14
```

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

000301

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 15

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

000302

Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Asp Thr Asn Thr Phe
 260 265 270
 Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn
 275 280 285
 Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
 290 295 300
 Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn
 325 330

<210> 16
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Polistes annularis

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 16

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

000303

355

360

365

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

<220>
 <223> hialuronidasa

<400> 17

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

- 000304

435	440	445
Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Lys Trp Cys Asp Lys Arg Gly Met		
450	455	460

<210> 18
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> Hialuronidasa 2

<400> 18
 Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Gly Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Lys Ala
 50 55 60
 Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Thr Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ser Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Gly Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Glu Lys Asp Val Tyr Arg Gln Ser Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Ser Asp Arg Val Met Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Asn Thr Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Gln His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ala Arg Asn Asp Gln Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asp Glu
 245 250 255
 Thr Leu Ala Ser Ser Val His Ser Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Arg Glu Ala Leu Arg Val Ala His Thr His His Ala Asn His Ala Leu
 275 280 285
 Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Thr Arg Gly Leu Thr Gly
 290 295 300
 Leu Ser Gln Val Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Ser Ala Gly Val Ile Phe Trp Gly Asp Ser Glu Asp Ala Ser Ser
 325 330 335
 Met Glu Thr Cys Gln Tyr Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Gln Leu Leu Val
 340 345 350
 Pro Tyr Ile Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Trp Thr
 355 360 365
 Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Asn
 370 375 380
 Thr Phe Leu His Leu Asn Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly His
 385 390 395 400
 Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Gln Leu Ser Glu Ala
 405 410 415

000305

Asp Leu Asn Tyr Leu Gln Lys His Phe Arg Cys Gln Cys Tyr Leu Gly
 420 425 430
 Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Arg Asn Tyr Lys Gly Ala Ala Gly Asn
 435 440 445
 Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu
 450 455 460
 Val Ala Val Ala Leu Thr Trp Thr Leu
 465 470

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

<220>
 <223> hialurinidasa 3

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

000306

Asp Asp Ser Leu Gly Ala Trp Asn Ser Phe Arg Cys His Cys Tyr Ser
 385 390 395 400
 Gly Trp Ala Gly Pro Thr Cys Leu Glu Pro Lys Pro
 405 410

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

<220>
 <223> hialauronidasa

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

000307

Gln Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Arg Gly Thr Trp Cys Glu Gln Gln
 420 425 430
 Gly Thr Arg
 435

<210> 21
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<220>
 <223> hialuronidasa 3

<400> 21
 Met Thr Met Gln Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Met Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Leu Arg Ala Pro Glu Arg Pro Phe Cys
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Ala Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gly Ile Thr Ala Asn His Gly Gln Arg
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Lys Ser Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Val Ser Leu Asp His His Leu Ala Arg Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His Arg Ser Leu Arg Pro Gly Phe Thr Gly Leu Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Gln Ala
 130 135 140
 Tyr Gln Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ala Gln Arg Val Tyr Pro Asn Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Gln Glu Gln Leu Cys Lys Ala Arg Ala Gly Phe Glu Glu Ala
 165 170 175
 Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Leu Gly Arg Met Leu Arg
 180 185 190
 Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
 195 200 205
 Trp His Gly Thr Ala Ser Asn Tyr Thr Gly His Cys His Ala Ala Ala
 210 215 220
 Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu Tyr Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Gly Leu Pro Pro Ala Tyr His
 245 250 255
 Gln Ala Phe Val Arg Tyr Arg Leu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
 260 265 270
 Val Gly His Pro His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Ala Arg Leu Thr
 275 280 285
 His Arg Asn Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Gln Thr
 290 295 300
 Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Val Val Leu Trp Gly
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Phe Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp His Leu Arg Gly
 325 330 335
 Tyr Leu Val Gly Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Arg Ala
 340 345 350
 Ala Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys Ala
 355 360 365
 Trp Gln Asp Pro Gly Gln Leu Lys Val Phe Leu His Leu His Pro Gly
 370 375 380
 Gly Ser Pro Gly Ala Trp Glu Ser Phe Ser Cys Arg Cys Tyr Trp Gly
 385 390 395 400
 Trp Ala Gly Pro Thr Cys Gln Glu Pro Arg Pro Glu Leu Gly Pro Glu
 405 410 415

000308

Glu Ala Thr

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

<220>
 <223> hialuronidasa 1

<400> 22

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

000309

Cys Arg Cys Tyr Arg Gly Trp Ser Gly Glu Trp Cys Lys Lys Gln Asp
 435 440 445
 Met

<210> 23
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <220>
 <223> hialuronidasa 2

<400> 23
 Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Ser Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Glu Ala
 50 55 60
 Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Met Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ala Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Ala Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Glu Lys Asp Val Tyr Arg Gln Ser Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Ser Asp Arg Ile Val Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Asn Thr Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Gln His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Asp Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ala Gln Asn Asp Gln Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Glu Asn Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asp Lys
 245 250 255
 Thr Leu Ala Ser Ser Lys His Ser Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala His Thr His His Ala Asn His Ala Leu
 275 280 285
 Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Thr Arg Arg Leu Thr Glu
 290 295 300
 Leu Asn Gln Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Ser Ala Gly Val Ile Phe Trp Gly Asp Ser Val Tyr Ala Ser Ser
 325 330 335
 Met Glu Asn Cys Gln Asn Leu Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Thr Leu Val
 340 345 350
 Pro Tyr Ile Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Trp Thr
 355 360 365
 Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Ser
 370 375 380
 Thr Phe Leu His Leu Ser Pro Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly Arg
 385 390 395 400
 Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Glu Leu Ser Glu Asp
 405 410 415
 Asp Leu Ser Tyr Leu Gln Met His Phe Arg Cys His Cys Tyr Leu Gly

000310

	420		425		430
Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Trp Asn His Lys Arg Ala Ala Gly Asp					
435		440		445	
Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ala His Leu Ala Ser Leu Leu Gly Leu					
450		455		460	
Val Ala Met Thr Leu Thr Trp Thr Leu					
465		470			

<210> 24
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> hialuronidasa 3

<400> 24

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

000311

385 390 395 400
 Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Leu Glu Pro Lys Pro
 405 410

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

<220>
 <223> PH20

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

000312

[illegible]

```
<210> 26
<211> 476
<212> PRT
<213> Ovis aries
```

<220>
<223> hialuronidasa 2

<400>	26														
Met	Trp	Thr	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Trp	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Ile	Phe	Thr
			20					25					30		
Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Val	Ala	Trp	Asp	Val	Pro	Thr	Gln	Asp	Cys	Gly
			35				40					45			
Pro	Arg	His	Lys	Met	Pro	Leu	Asp	Pro	Lys	Asp	Met	Lys	Ala	Phe	Asp
						55					60				
Val	Gln	Ala	Ser	Pro	Asn	Glu	Gly	Phe	Val	Asn	Gln	Asn	Ile	Thr	Ile
65					70					75				80	
Phe	Tyr	Arg	Asp	Arg	Leu	Gly	Met	Tyr	Pro	His	Phe	Asn	Ser	Val	Gly
				85					90					95	
Arg	Ser	Val	His	Gly	Gly	Val	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Leu	Trp	Val	His
			100					105					110		
Leu	Glu	Met	Leu	Lys	Gly	His	Val	Glu	His	Tyr	Ile	Arg	Thr	Gln	Glu
			115				120					125			
Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Trp	Glu	Asp	Trp	Arg	Pro	Val	Trp
			130			135					140				
Val	Arg	Asn	Trp	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Tyr	Arg	Arg	Leu	Ser	Arg	Gln
145					150					155				160	
Leu	Val	Ala	Ser	His	His	Pro	Asp	Trp	Pro	Pro	Glu	Arg	Ile	Val	Lys
				165					170					175	
Glu	Ala	Gln	Tyr	Glu	Phe	Glu	Phe	Ala	Ala	Arg	Gln	Phe	Met	Leu	Glu
			180					185					190		
Thr	Leu	Arg	Phe	Val	Lys	Ala	Phe	Arg	Pro	Arg	His	Leu	Trp	Gly	Phe
			195				200					205			
Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His	Asp	Tyr	Val	Gln	Asn	Trp	Glu
			210			215					220				
Thr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Cys	Pro	Asp	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Asp	Gln
225					230					235				240	
Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr
				245					250					255	
Leu	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Thr	His	Gly	Arg	Asn	Phe	Val	Ser
			260					265					270		
Phe	Arg	Val	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Val	His	His	Ala	Asn
			275				280					285			
His	Ala	Leu	Pro	Val	Tyr	Val	Phe	Thr	Arg	Pro	Thr	Tyr	Ser	Arg	Gly
						295					300				
Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Glu	Met	Asp	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Gly	Glu	Ser

- 000313

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

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

<220>
 <223> secuencia parcial PH20

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

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

<220>
 <223> hialuronidasa 3

<400> 28
 Met Thr Thr Arg Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Lys Ser Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu

000314

65					70					75				80
Tyr	Pro	Tyr	Phe	Gly	Pro	Lys	Gly	Thr	Ala	His	Asn	Gly	Gly	Ile
				85					90					95
Gln	Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Arg	His	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Gln
			100					105					110	
His	His	Ser	Leu	Arg	Pro	Gly	Phe	Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Asp
		115					120					125		
Glu	Glu	Trp	Cys	Pro	Leu	Trp	Ala	Gly	Asn	Trp	Gly	Arg	Arg	Arg
	130					135					140			
Tyr	Gln	Ala	Ala	Ser	Trp	Ala	Trp	Ala	Gln	Gln	Val	Phe	Pro	Asp
145					150					155				160
Asp	Pro	Gln	Glu	Gln	Leu	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Thr	Gly	Phe	Glu	Gln
				165					170					175
Ala	Arg	Ala	Leu	Met	Glu	Asp	Thr	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Ala	Leu
			180					185					190	

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

<210> 29
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<220>
 <223> PH20

<400> 29
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Val Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95

000315

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

<220>
 <223> PH20

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

000316

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

000317

```
<211> 512
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
```

<220>
<223> PH20

<400>	31														
Met 1	Gly	Glu	Leu	Gln 5	Phe	Lys	Trp	Leu 10	Phe	Trp	Arg	Ser	Phe	Ala 15	Glu
Ser	Gly	Gly	Thr 20	Phe	Gln	Thr	Val 25	Leu	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile 30	Pro	Tyr
Ser	Leu	Thr 35	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala 40	Thr	Pro	Val	Leu	Ser 45	Asp	Thr	Thr
Phe	Val 50	Trp	Val	Trp	Asn 55	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Cys 60	Val	Glu	Asn	Val
Thr 65	Glu	Pro	Ile	Asp 70	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Leu 75	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg 80
Lys	Thr	Ala	Ile 85	Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Leu 90	Phe	Tyr	Val	Asp 95	Arg	Leu
Gly	Asn	Tyr	Pro 100	His	Ile	Asp	Ala	Gln 105	Gln	Thr	Glu	His	His 110	Gly	Gly
Ile	Pro	Gln 115	Lys	Gly	Asp	Leu	Thr 120	Thr	His	Leu	Val	Lys 125	Ala	Lys	Glu
Asp	Val 130	Glu	Arg	Tyr	Ile	Pro	Thr 135	Asp	Lys	Leu	Gly 140	Leu	Ala	Ile	Ile
Asp 145	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg 150	Pro	Thr	Trp	Met	Arg	Asn 155	Trp	Thr	Pro	Lys
Asp	Ile	Tyr	Arg 165	Asn	Lys	Ser	Ile	Glu	Leu 170	Val	Gln	Ala	Ala 175	Asp	Pro
Ala	Ile	Asn 180	Ile	Thr	Glu	Ala	Thr 185	Val	Arg	Ala	Lys	Ala	Gln 190	Phe	Glu
Gly	Ala 195	Ala	Lys	Glu	Phe	Met	Glu 200	Gly	Thr	Leu	Lys	Leu 205	Gly	Lys	His
Ile	Arg 210	Pro	Lys	His	Leu	Trp 215	Gly	Phe	Tyr	Leu	Phe 220	Pro	Asp	Cys	Tyr
Asn 225	Asn	Lys	Phe	Gln 230	Val	Asp	Asn	Tyr	Asp	Gly 235	Gln	Cys	Pro	Asp	Val 240
Glu	Lys	Lys	Arg 245	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Trp 250	Leu	Trp	Lys	Glu	Ser	Thr 255
Gly	Leu	Tyr 260	Pro	Ser	Val	Tyr	Leu 265	Lys	Lys	Asp	Leu	Lys	Ser 270	Ser	Arg
Lys	Ala 275	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Tyr 280	Arg	Val	Leu	Glu	Ser 285	Ile	Arg	Val
Ser	Lys 290	Val	Ser	Asp	Glu	Ser	Asn 295	Pro	Val	Pro	Ile	Phe 300	Val	Tyr	Ile
Arg 305	Leu	Val	Phe	Thr	Asp 310	His	Val	Ser	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp 320
Leu	Val	Asn	Thr 325	Ile	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Gly	Ile 335
Ile	Ile	Trp	Asp 340	Ala	Met	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Ser	Ala	Gly	Cys	Pro
Ile	Leu	Arg 355	Gln	Tyr	Met	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Tyr	Ile	Val	Asn
Val	Thr 370	Leu	Ala	Ala	Lys	Met	Cys	Ser	Gln	Thr	Leu	Cys	Lys	Glu	Lys
Gly 385	Met	Cys	Ser	Arg 390	Lys	Thr	Glu	Ser	Ser	Asp	Ala	Tyr	Leu	His	Leu
Asp	Pro	Ser	Ser 405	Phe	Ser	Ile	Asn	Val	Thr	Glu	Ala	Gly	Lys	Tyr	Glu
Val	Leu	Gly 420	Lys	Pro	Glu	Val	Lys	Asp	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	His
Phe	Lys 435	Cys	Ser	Cys	Phe	Ser	Lys	Met	Thr	Cys	Glu	Glu	Thr	Ser	Asp
Met	Arg 450	Ser	Ile	Gln	Asp	Val	Asn	Val	Cys	Met	Gly	Asp	Asn	Val	Cys

000318

Ile Lys Ala Thr Leu Gly Pro Asn Ser Ala Phe His Leu Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Lys Gly Leu Leu Leu Met Thr Thr Leu Ala His Ile Leu His His Leu
 485 490 495
 Pro His Asp Ile Phe Val Phe Pro Trp Lys Met Leu Val Ser Thr Pro
 500 505 510

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

<220>
 <223> PH20

<400> 32
 Met Gly Glu Leu Arg Phe Lys His Leu Phe Trp Gly Ser Phe Val Glu
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Phe Gln Thr Val Leu Ile Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Ser Leu Thr Val Asp Tyr Arg Ala Ala Pro Ile Leu Ser Asn Thr Thr
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ile Trp Asn Val Pro Thr Glu Arg Cys Val Gly Asn Val
 50 55 60
 Asn Asp Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Thr Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Leu Tyr Pro His Ile Asp Ala Asn Gln Ala Glu His Tyr Gly Gly
 100 105 110
 Ile Pro Gln Arg Gly Asp Tyr Gln Ala His Leu Arg Lys Ala Lys Thr
 115 120 125
 Asp Ile Glu His Tyr Ile Pro Asp Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Leu Arg Asn Trp Lys Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Asn Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Gln Ser Thr Asn Pro
 165 170 175
 Gly Leu Ser Ile Thr Glu Ala Thr Gln Lys Ala Ile Gln Gln Phe Glu
 180 185 190
 Glu Ala Gly Arg Lys Phe Met Glu Gly Thr Leu His Leu Gly Lys Phe
 195 200 205
 Leu Arg Pro Asn Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210 215 220
 Asn Asn Lys Phe Gln Asp Pro Lys Tyr Asp Gly Gln Cys Pro Ala Val
 225 230 235 240
 Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asn Leu Lys Trp Leu Trp Lys Ala Ser Thr
 245 250 255
 Gly Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser Asn Arg
 260 265 270
 Gln Ala Thr Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Val Val Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Val Gly Asn Ala Ser Asp Pro Val Pro Ile Phe Val Tyr Ile
 290 295 300
 Arg Leu Val Phe Thr Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Thr Ser Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ile Trp Asp Ala Met Ser Leu Ala Gln Arg Ala Ala Gly Cys Pro
 340 345 350
 Ile Leu His Lys Tyr Met Gln Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Val Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Asn Glu Lys
 370 375 380
 Gly Met Cys Ser Arg Arg Lys Glu Ser Ser Asp Val Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400

000319

Asn Pro Ser His Phe Asp Ile Met Leu Thr Glu Thr Gly Lys Tyr Glu
 405 410 415
 Val Leu Gly Asn Pro Arg Val Gly Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
 420 425 430
 Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Arg Met Thr Cys Lys Glu Thr Ser Asp
 435 440 445
 Val Lys Asn Val Gln Asp Val Asn Val Cys Val Gly Asp Asn Val Cys
 450 455 460
 Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
 485 490 495
 Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
 500 505 510

<210> 33
 <211> 807
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<220>
 <223> hialuronidasa
 <400> 33
 Met Thr Tyr Arg Ile Lys Lys Trp Gln Lys Leu Ser Thr Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Met Ala Gly Val Ile Thr Leu Asn Gly Gly Glu Phe Arg Ser Val
 20 25 30
 Asp Lys His Gln Ile Ala Val Ala Asp Thr Asn Val Gln Thr Pro Asp
 35 40 45
 Tyr Glu Lys Leu Arg Asn Thr Trp Leu Asp Val Asn Tyr Gly Tyr Asp
 50 55 60
 Lys Tyr Asp Glu Asn Asn Pro Asp Met Lys Lys Lys Phe Asp Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Glu Ala Thr Asn Leu Leu Lys Glu Met Lys Thr Glu Ser Gly
 85 90 95
 Arg Lys Tyr Leu Trp Ser Gly Ala Glu Thr Leu Glu Thr Asn Ser Ser
 100 105 110
 His Met Thr Arg Thr Tyr Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ala Glu Ala Met
 115 120 125
 Arg Asn Pro Lys Thr Thr Leu Asn Thr Asp Glu Asn Lys Lys Lys Val
 130 135 140
 Lys Asp Ala Leu Glu Trp Leu His Lys Asn Ala Tyr Gly Lys Glu Pro
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys Val Lys Glu Leu Ser Glu Asn Phe Thr Lys Thr Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Thr Asn Leu Asn Trp Trp Asp Tyr Glu Ile Gly Thr Pro Lys
 180 185 190
 Ser Leu Thr Asn Thr Leu Ile Leu Leu Asn Asp Gln Phe Ser Asn Glu
 195 200 205
 Glu Lys Lys Lys Phe Thr Ala Pro Ile Lys Thr Phe Ala Pro Asp Ser
 210 215 220
 Asp Lys Ile Leu Ser Ser Val Gly Lys Ala Glu Leu Ala Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Asn Leu Val Asp Ile Ser Lys Val Lys Leu Leu Glu Cys Ile Ile Glu
 245 250 255
 Glu Asp Lys Asp Met Met Lys Lys Ser Ile Asp Ser Phe Asn Lys Val
 260 265 270
 Phe Thr Tyr Val Gln Asp Ser Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asn Gly Phe
 275 280 285
 Tyr Lys Asp Gly Ser Tyr Ile Asp His Gln Asp Val Pro Tyr Thr Gly
 290 295 300
 Ala Tyr Gly Val Val Leu Leu Glu Gly Ile Ser Gln Met Met Pro Met
 305 310 315 320
 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
 325 330 335
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu

000320

			340					345					350		
Met	Met	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Glu	Thr
		355					360					365			
Ser	His	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser
	370					375					380				
Asp	Ala	Met	Asp	Asp	Ser	Thr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Val	Lys
385					390					395					400
Ser	Ser	Val	Glu	Ser	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asn
				405					410					415	
Ser	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Asp	Asn	Ser
			420					425					430		
Ile	Ser	Lys	Asn	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp	Met
		435					440					445			
Asp	Arg	Val	Thr	Tyr	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Met	Thr	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ser	Ile	Asn	Gly	Glu
465					470					475					480
Asn	Leu	Lys	Gly	Trp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
				485					490					495	
Ser	Asp	Val	Lys	His	Tyr	His	Asp	Asn	Phe	Trp	Val	Thr	Ala	Asp	Met
			500					505					510		
Lys	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp
		515					520					525			
Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
	530					535					540				
Asp	Asp	Gln	His	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Asp	Lys
545					550					555					560
Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Tyr	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Lys	Ile	Val
				565					570					575	
Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Val
			580					585					590		
Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Asp
		595					600					605			
Asp	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Gln	Glu	Asn	Asn	Ser	Val	Phe
	610					615					620				
Leu	Glu	Ser	Thr	Asp	Thr	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Tyr	His	Phe	Leu	Asn
625					630					635					640
Lys	Pro	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Ser	His	Thr	Gly	Lys	Trp	Lys
				645					650					655	
Glu	Ile	Asn	Lys	Ser	Gln	Lys	Asp	Thr	Gln	Lys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Tyr
			660					665					670		
Glu	Val	Thr	Gln	Lys	His	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Val
		675					680					685			
Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Asp	Glu
	690														

<210> 34

<211> 371

<212> PRT

<213> bacteriofago H4489A de Streptococcus pyogenes

<220>

000321

<223> hialuronidasa

<400> 34

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

<210> 35

<211> 1628

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<220>

<223> hialuronidasa

<400> 35

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

000322

Ser	Tyr	Ser	Gly	Gly	Glu	Phe	Gln	Ile	Ser	Asp	Glu	Ile	Asn	Ile	Val	50	55	60
Tyr	Asp	Asp	Gly	Ile	Asp	Thr	Tyr	Thr	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	Glu	Val	65	70	75
Leu	Glu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Ser	Asn	Glu	Ile	Val	Pro	85	90	95
Gly	Lys	Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Val	100	105	110
Asp	Asn	Tyr	Phe	Asn	Lys	Asn	Ile	Pro	His	Asp	Glu	Ser	Phe	Phe	Asp	115	120	125
Glu	Lys	Met	Asp	Ala	Asn	Ile	Val	Ser	Val	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Gly	130	135	140
Val	Ile	Gly	Glu	Asp	Thr	Asp	Ser	Ala	Phe	Tyr	Gly	Val	Thr	Thr	Leu	145	150	155
Lys	His	Val	Phe	Asn	Gln	Leu	Glu	Glu	Gly	Asn	Lys	Ile	Gln	Ser	Phe	165	170	175
Arg	Ala	Asp	Asp	Tyr	Ala	Glu	Val	Ala	His	Arg	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	180	185	190
Tyr	Tyr	Gly	Asn	Pro	Trp	Ser	Asn	Glu	Asp	Arg	Ala	Glu	Leu	Met	Lys	195	200	205
Phe	Gly	Gly	Asp	Tyr	Lys	Leu	Asn	Gln	Tyr	Val	Phe	Ala	Pro	Lys	Asp	210	215	220
Asp	Pro	Tyr	His	Asn	Ser	Lys	Trp	Arg	Asp	Leu	Tyr	Pro	Glu	Glu	Lys	225	230	235
Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Val	Gly	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	245	250	255
Arg	Tyr	Val	Tyr	Ala	Leu	His	Pro	Phe	Met	Asn	Asn	Pro	Val	Arg	Phe	260	265	270
Asp	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Val	Ile	Lys	Ala	Lys	275	280	285
Phe	Thr	Gln	Leu	Leu	Glu	Asn	Asp	Val	Arg	Gln	Phe	Ala	Ile	Leu	Ala	290	295	300
Asp	Asp	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Gln	Gly	Ala	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Leu	305	310	315
Leu	Thr	Asp	Leu	Thr	Arg	Trp	Leu	Glu	Glu	Gln	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	325	330	335
Asp	Leu	Lys	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Cys	Pro	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Asn	340	345	350
Gly	Ser	Ser	Ala	Gln	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Lys	Ala	Glu	Asp	Asn	Val	355	360	365
Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gly	Gly	Arg	Ile	Trp	Gly	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	370	375	380
Phe	Ala	Asn	Asn	Phe	Met	Asn	Asn	Ile	Ser	Thr	Glu	Gly	His	Pro	Gly	385	390	395
Arg	Ala	Pro	Phe	Phe	Trp	Ile	Asn	Trp	Pro	Cys	Ser	Asp	Asn	Ser	Lys	405	410	415
Gln	His	Leu	Ile	Met	Gly	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Leu	His	Pro	Gly	Val	420	425	430
Asp	Pro	Ser	Lys	Ile	Asp	Gly	Ile	Val	Leu	Asn	Pro	Met	Gln	Gln	Ala	435	440	445
Glu	Ala	Asn	Lys	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	450	455	460
Ile	Trp	Asp	Asn	Lys	Glu	Glu	Ala	Asp	Glu	Asn	Trp	Asn	Asp	Ser	Phe	465	470	475
Lys	Tyr	Met	Asp	His	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ser	Leu	Ala	485	490	495
Leu	Arg	Glu	Ile	Ser	Lys	His	Met	Ile	Asn	Gln	Asn	Met	Asp	Gly	Arg	500	505	510
Val	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Ala	Pro	Lys	Leu	Glu	Ala	515	520	525
Phe	Lys	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile	Lys	Glu	Asp	Ala	Leu	530	535	540
Glu	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe	Thr	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr	545	550	555
Lys	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Tyr	Trp	565	570	575
Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	Asp	Thr	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Lys			

000323

000324

1105	1110	1115	1120
Asp Thr Glu Val	Asp His Val Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Ser Leu		
	1125	1130	1135
Asp Gly Glu Thr Trp Thr Asp Ala Ile Thr Ile Gly Asp Gly Val Glu			
	1140	1145	1150
Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys			
	1155	1160	1165
His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val			
	1170	1175	1180
Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe			
1185	1190	1195	1200
Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile			
	1205	1210	1215
Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser			
	1220	1225	1230
Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly			
	1235	1240	1245
Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser			
	1250	1255	1260
Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys			
1265	1270	1275	1280
Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met			
	1285	1290	1295
Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln			
	1300	1305	1310
Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr			
	1315	1320	1325
Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn			
	1330	1335	1340
Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn			
1345	1350	1355	1360
Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp			
	1365	1370	1375
Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu			
	1380	1385	1390
Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp			
	1395	1400	1405
Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg			
	1410	1415	1420
Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser			
1425	1430	1435	1440
Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu			
	1445	1450	1455
Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr			
	1460	1465	1470
Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys			
	1475	1480	1485
Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu			
	1490	1495	1500
Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe			
1505	1510	1515	1520
Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu			
	1525	1530	1535
Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu			
	1540	1545	1550
Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe			
	1555	1560	1565
Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly			
	1570	1575	1580
Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser			
1585	1590	1595	1600
Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu			
	1605	1610	1615
Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn			
	1620	1625	

- 000325

<210> 36
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-1 [Precursor]

<400> 36
 Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Asp Met Ala Gln Gly Phe Arg Gly Pro Leu Leu Pro Asn Arg Pro Phe
 20 25 30
 Thr Thr Val Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Glu Arg His Gly
 35 40 45
 Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Pro Gly Gln
 50 55 60
 Thr Phe Arg Gly Pro Asp Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu
 85 90 95
 Pro Gln Asn Ala Ser Leu Ile Ala His Leu Ala Arg Thr Phe Gln Asp
 100 105 110
 Ile Leu Ala Ala Ile Pro Ala Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
 115 120 125
 Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Thr Lys
 130 135 140
 Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Ala Gln His Pro
 145 150 155 160
 Asp Trp Pro Ala Pro Gln Val Glu Ala Val Ala Gln Asp Gln Phe Gln
 165 170 175
 Gly Ala Ala Arg Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Arg Ala
 180 185 190
 Leu Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr
 195 200 205
 Asn Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Ser Gly
 210 215 220
 Ile Arg Ala Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Met Pro Ala Val Leu Glu Gly Thr Gly
 245 250 255
 Lys Ser Gln Met Tyr Val Gln His Arg Val Ala Glu Ala Phe Arg Val
 260 265 270
 Ala Val Ala Ala Gly Asp Pro Asn Leu Pro Val Leu Pro Tyr Val Gln
 275 280 285
 Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu
 290 295 300
 His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu
 305 310 315 320
 Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr
 340 345 350
 Ser Gly Ala Leu Leu Cys Ser Gln Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg
 355 360 365
 Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu Leu Asn Pro
 370 375 380
 Ala Ser Phe Ser Ile Gln Leu Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Ser Leu
 385 390 395 400
 Arg Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Gln Ala Gln Met Ala Val Glu Phe
 405 410 415
 Lys Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Gln Ala Pro Trp Cys Glu Arg Lys
 420 425 430
 Ser Met Trp
 435

000326

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

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

<400> 37

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

- 000327

Ala Ser Glu Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Ala Leu
 450 455 460
 Ala Ala Leu Ala Phe Thr Trp Thr Leu
 465 470

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

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

<400> 38
 Met Thr Thr Gln Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Glu Ala Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Arg Ala
 130 135 140
 Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
 165 170 175
 Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
 180 185 190
 Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
 195 200 205
 Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu His Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala His His
 245 250 255
 Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
 260 265 270
 Val Gly His Arg His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu Thr
 275 280 285
 His Arg Arg Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Asp Leu Val Gln Ser
 290 295 300
 Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp Gly
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp His Leu His Asp
 325 330 335
 Tyr Leu Val Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Arg Ala
 340 345 350
 Ala Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys Ala
 355 360 365
 Arg Arg Asp Pro Gly Gln Met Glu Ala Phe Leu His Leu Trp Pro Asp
 370 375 380
 Gly Ser Leu Gly Asp Trp Lys Ser Phe Ser Cys His Cys Tyr Trp Gly
 385 390 395 400
 Trp Ala Gly Pro Thr Cys Gln Glu Pro Arg Pro Gly Pro Lys Glu Ala
 405 410 415

000328

Val

<210> 39
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hialuronidasa-4

<400> 39

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

000329

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

<210> 40
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-467 de sHuPH20

<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

000330

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

<210> 41
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> sHuPH20 precursor 1-477

<400> 41
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350

000331

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

<210> 42

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> precursor 1-478 de sHuPH20

<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

000332

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

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

<220>
 <223> precursor 1-479 de sHuPH20

<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		

000333

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

<210> 44
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-480 sHuPH20

<400> 44

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

- 000334

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

```
<210> 45
<211> 481
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<223> precursor 1-481 de sHuPH20
```

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

000335

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
					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
					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	
Phe															480

<210> 46
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> precursor 1-483 sHuPH20

<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

000336

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

<210> 47

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 maduro 36-467

<400> 47

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

000337

145		150		155		160									
Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Arg
		165		170		175									
Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asn	His
		180		185		190									
His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ile
		195		200		205									
Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu
		210		215		220									
Tyr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Gln	Gln	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Thr
225				230		235									240
Leu	Tyr	Val	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Ile	Arg	Val	Ser	Lys	Ile
			245			250								255	

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

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> sHuPH20 maduro 36-483

<400> 48

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

000338

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

<210> 49

<211> 1446

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ADN que codifica el rHuPH20 soluble "precursor"

<400> 49

atgggagtg taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaattc aagtggagta 60
 tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccgaag tgaattttgt 180
 cttggaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
 ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacathtt atatgccagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttgggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
 ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcaggga ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
 tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttgtag atgaaagcac tgctctttac 780
 ccatccatht atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggt 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 ctacgagcca aaatgtgtag ccaagtgtct 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200

000339

```

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

<220>
 <223> PH20 P48A variante

```

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

Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
          275         280         285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
          290         295         300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305         310         315         320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
          325         330         335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
          340         345         350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
          355         360         365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
          370         375         380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385         390         395         400

```

000340

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

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

<220>
 <223> precursor PH20 L499W variante

<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

000341

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

<210> 52
 <211> 6630
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> vector HZ24

<400> 52
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaatgg ccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
 caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
 cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
 tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgctg gtagtttatc acagttaaat 780
 tgctaacgca gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgggtc 840
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
 actgggcttg tctgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
 catctttttc agaagctttg ttaaatacaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct 1140
 tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
 tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
 agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320
 tacaatatat tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
 aactgtgaat ggaggaatcc ccagagaagt ttccttaca gaccatctgg acaaagctaa 1440
 gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
 agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaata gatgtttaca agaatagggtc 1560
 tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
 aaaacaagaa tttgaaaagg caggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
 attacttcgg ccaaatcact tgtgggggta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca 1740
 ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
 tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860
 gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccacagagt 1920
 ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980
 tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040

000342

tggtgctctg	ggtgcttctg	gaattgtaat	atggggaacc	ctcagtataa	tgcaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgctcctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgtcttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgctattca	2280
acttgagaaa	ggtggaaagt	tcacagtacg	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
atcttctgaa	aaatcttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgtaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgctgat	ggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaattttc	tactgaggat	ccatagctaa	2520
cgccccctctc	cctccccccc	ccctaaccgtt	actggccgaa	gccgcttgga	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	atcttccacc	atattgccgt	cttttggcaa	tgtgagggcc	2640
cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	gtctttcccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaaac	ccccacctgg	cgacaggtgc	2820
ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccagtgc	2880
cacgttgtga	gttgatagtg	tgtggaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtagcc	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	agaatctggg	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcttgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atcttcttgc	caaaagtgtg	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagtaga	catggtttgg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgcacagt	ttttcccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgagggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgaccccg	3720
gcggccgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggaacaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	tatttgtaac	3840
cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	3900
tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgcgcagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcgcggggt	4080
gtggtggtta	cgcgacgcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	4140
gctttottcc	cttccctttc	cgccacgttc	gccggctttc	cccgtcaagc	tctaaatcgg	4200
gggctccctt	tagggttccg	atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
taggggtgat	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttctg	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaacctt	4380
atctcggctt	attcttttga	tttataaggg	atcttgcgga	tttcggccta	ttggttaaaa	4440
aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaaat	4500
tctctgatgc	gtattttctc	cttacgcata	tgtgcggtat	ttcacaccgc	atatggtgca	4560
ctctcagtag	aatctgctct	gatgccgcac	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	atcttcgctg	cgcccttatt	cccttttttg	4980
cggcattttg	ccttcctggt	tttgctcacc	cagaaaacgt	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	5100
ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgcgg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	5220
attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
tgacagtaag	agaattatgc	agtgcgtcca	taaccatgag	tgataaacact	gcggccaact	5340
tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
atcatgtaac	tcgccttgat	cgttggggaa	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	5460
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaaact	ttactggcg	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	attggttaact	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	cgggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	6060

000343

```

caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtttctt 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggaactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

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

<220>
 <223> dihidrofolato reductasa

<400> 53

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

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

<220>
 <223> etiqueta His

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

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

<220>
 <223> etiqueta Flag

000344

<400> 55

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 56

<211> 1449

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> secuencia de mRNA Gen2

<400> 56

```

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

```

000345

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 March 2011 (24.03.2011)



(10) International Publication Number
WO 2011/034604 A9

(51) International Patent Classification:

A61K 9/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) C07K 16/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/002545

(22) International Filing Date:

16 September 2010 (16.09.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/277,045 17 September 2009 (17.09.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): BAXTER HEALTHCARE, S.A. [CH/CH]; Thurgauerstrasse 130, CH-8152 Glattpark (Opfikon) (CH). BAXTER INTERNATIONAL, INC. [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TESCHNER, Wolfgang [DE/AT]; Gestettengasse 19/14, A-1030 Wien (AT). SVATOS, Sonja [AT/AT]; Kapellengasse 42, A-2413 Berg (AT). BRUCKSCHWAIGER, Leopold [AT/AT]; Herminengasse 5/14, A-1020 Wien (AT). WEBER, Alfred [AT/AT]; Skraupstrasse 24/42/8, A-1210 Wien (AT). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Weimarer Strasse 76, A-1180 Wien (AT). LEI, Laura [US/US]; 11452 Clarkson Road, Los Angeles, CA 90064 (US).

(74) Agents: SEIDMAN, Stephanie, L. et al.; McKenna Long & Aldridge LLP, 4435 Eastgate Mall, Suite 400, San Diego, CA 92121 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

1 December 2011

(48) Date of publication of this corrected version:

19 January 2012

(15) Information about Corrections:

see Notice of 19 January 2012

Previous Correction:

see Notice of 28 July 2011

(54) Title: STABLE CO-FORMULATION OF HYALURONIDASE AND IMMUNOGLOBULIN, AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: Provided herein are stable co-formulations of immunoglobulin and hyaluronidase that are stable to storage in liquid form at room temperature for at least 6 months and at standard refrigerator temperatures for 1-2 years. Such co-formulations can be used in methods of treating IG-treatable diseases or conditions by subcutaneous administration.

WO 2011/034604 A9

000346

3088PC

SCB/480
Records 236
L.O. on Cont. 6-2-12
in City

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

To:

Baldock, Sharon Claire
Boult Wade Tennant
Verulam Gardens
70 Gray's Inn Road
GB-London WC1X 8BT
ROYAUME UNI

Date of mailing
(day/month/year) 02.03.2012

Applicant's or agent's file reference SCB/P114921WO00		IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2010/002545	International filing date (day/month/year) 16.09.2010	Priority date (day/month/year) 17.09.2009
Applicant Baxter Healthcare S.A.		

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

000347

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Hohmann, Birgit Tel. +49 89 2399-8798
---	--



PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SCB/P114921WO00	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/US2010/002545	International filing date (day/month/year) 16.09.2010	Priority date (day/month/year) 17.09.2009	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K9/00			
Applicant Baxter Healthcare S.A.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>17</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand		Date of completion of this report	
12.01.2012		02.03.2012 000348	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Kronester-Frei, A Telephone No. +49 89 2399-8555	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2010/002545

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-156 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-56 as originally filed

Claims, Numbers

1-55 filed with the letter of

12-01-2012

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis and 70.2(e)).

000349

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2010/002545

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

000350

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2010/002545

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 The following documents (D) are referred to in this communication; the numbering corresponds to the order used in the Search Report, the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1 US 2006/104968 A1 (BOOKBINDER LOUIS H [US] ET AL) 18 May 2006 (2006-05-18)
- D2 US 2008/171014 A1 (WU CHENGBIN [US] ET AL) 17 July 2008 (2008-07-17)
- D3 MISBAH S ET AL: "Subcutaneous immunoglobulin: opportunities and outlook", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB,
vol. 158, no. Suppl. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 51-59, XP002585722,
ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/J.1365-2249.2009.04027.X
[retrieved on 2009-10-30]
- D4 BOOKBINDER ET AL: "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics",
JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL,
vol. 114, no. 2, 28 August 2006 (2006-08-28), pages 230-241, XP005625403,
ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2006.05.027
- D5 LEESCH V W ET AL: "30-Day Pharmacokinetic Evaluation of IV versus Subcutaneous Administration of Immunoglobulin with and without Recombinant Human Hyaluronidase in Dogs",
JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY, INC, US,
vol. 123, no. 2, Suppl. S, 1 February 2009 (2009-02-01), page S10, XP002541722,
ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2008.12.051
- D6 EP 0 278 422 A2 (GREEN CROSS CORP [JP]) 17 August 1988 (1988-08-17)
- D7 MELAMED I R ET AL: "Recombinant human hyaluronidase facilitates dispersion of subcutaneously administered Gammagard liquid and enables administration of a full monthly dose in a single site to patients with immunodeficiency diseases",
JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY, INC, US,
vol. 121, no. 2, Suppl. 1, 1 February 2008 (2008-02-01), page S83, XP002541721,
ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2007.12.332

000351

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2010/002545

- D8 WO 2009/117085 A1 (BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; BAXTER INT [US];
HALOZYME INC [US]; SCHIFF) 24 September 2009 (2009-09-24)
- D9 SKODA-SMITH SUZANNE ET AL: "Subcutaneous immunoglobulin replacement therapy
in the treatment of patients with primary immunodeficiency disease.",
THERAPEUTICS AND CLINICAL RISK MANAGEMENT 2010 LNKD- PUBMED:
20169031,
vol. 6, 2010, pages 1-10, XP000002657372,
ISSN: 1178-203X

Unless otherwise specified, the relevant passages of the documents cited can be taken from the International Search Report.

D1: Co-formulations of sHASEGP (= rHuPH20) with other substances for injectable pens for small volume or rapid subcutaneous administration. A variety of pharmacologic agents (including immune globulins) are parenterally-administered and their delivery and/or bioavailability enhanced through co-formulation and/or co-administration with sHASEGPs; Mouse IgG Kappa chain leader peptide sHASEGP fusion constructs were tested for higher levels of secreted neutral active sHASEGP activity; Female Balb/c mice were injected subcutaneously with 20 µl of 0.5 mg/ml solution of biotinylated mouse IgG mixed with 20 µl of either saline or 20 µl sHASEGP containing 4 Units of activity; high Unit dose of human sHASEGP is preferable including from 500-100,000 Units per ml. pH dependency of Hyaluronidases in respect of buffers used, like 50 mM formate (pH 3-4.5), 50 mM acetate (pH 5-6) or 50 mM MES (pH 6-7).

D2: Antibody or antibody-portions (typically including immunoglobulins) will be prepared as an injectable solution containing 0.1-250 mg/ml antibody, liquid or lyophilized dosage form in a flint or amber vial, ampule or pre-filled syringe. The buffer can be L-histidine (1-50 mM), optimally 5-10 mM, at pH 5.0 to 7.0 (optimally pH 6.0). Other suitable buffers are sodium succinate, sodium citrate, sodium phosphate or potassium phosphate. Sodium chloride can be used to modify the toxicity of the solution at a concentration of 0-300 mM (optimally 150 mM for a liquid dosage form). Cryoprotectants can be included for a lyophilized dosage form, principally 0-10% sucrose (optimally 0.5-1.0%). Other suitable cryoprotectants include trehalose and lactose. Bulking agents can be included for a lyophilized dosage form, principally 1-10% mannitol (optimally 24%). Stabilizers can be used in both liquid and lyophilized dosage forms, principally 1-50 mM L-Methionine (optimally 5-10 mM). Other suitable

bulking agents include glycine, arginine, can be included as 0-0.05% polysorbate-80 (optimally 0.005-0.01%). Pharmaceutical composition comprising antibodies/antibody-
portions prepared as an injectable solution for parenteral administration, can further
comprise an adjuvant in order to increase absorption, or dispersion of therapeutic
protein (e.g., antibody), particularly useful adjuvant is hyaluronidase, such as Hylenex
(R) (recombinant human hyaluronidase). Addition of hyaluronidase in the injectable
solution improves human bioavailability following parenteral administration, particularly
subcutaneous administration. Therapeutic compositions typically must be sterile and
stable under the conditions of manufacture and storage.

D3: Use of subcutaneous immunoglobulin (SCIg) for treatment may further be
beneficial in autoimmune neurological conditions, such as multi-focal motor
neuropathy; controlled trials directly comparing the s.c. and i.v. routes are still to be
performed. Hyaluronidase-facilitated administration increases bioavailability of SCIg,
enabling administration of larger volumes at a single site. Alternatively, more
concentrated formulations may reduce the volume required for administration, and a
rapid-push technique may allow for shorter administration times.

D4: 48 experimentally naive rhesus monkeys were dosed with 0, 130, 3,800, and
38,000 Units of rHuPH20 in 1 ml of 10 mM Phosphate, pH 7.4 with 1 mM EDTA, 1 mM
CaCl₂, and 144 mM NaCl with 1 mg/ml human serum albumin via subcutaneous
injection on Day 1 (scapular region). Some animals received an additional dose on
Day 8. Blood samples were collected for evaluation of clinical pathology from all
animals 48 h after the initial dose (Day 3) and on Days 10 and 29, and for antibody
analysis on Day 21 and 28.

D5: 30-Day Pharmacokinetic Evaluation of IV versus Subcutaneous Administration
of Immunoglobulin with and without Recombinant Human Hyaluronidase in Dogs

D6: Stable gamma globulin formulations, IgG, buffered including sorbitol, pH 5.5 and
PEG, being in intravenously injectable solution of chemically unmodified gamma-
globulin or gamma-globulin monomer having a complete molecular structure, said
solution containing sorbitol as a stabilizer and having a low electrical conductivity and
a pH of about 5.5 +/- 0.2.

D7: Recombinant human hyaluronidase facilitates dispersion of subcutaneously
administered Gammagard liquid and enables administration of a full monthly dose in a
single site to patients with immunodeficiency diseases

2 The priority documents pertaining to the present application were not available
at the time of establishing this first written opinion. Hence, it is based on the
assumption that all claims enjoy priority rights from the filing date of the

priority document. If it later turns out that this is not correct, the documents D8 and D9 cited in the International Search Report could become relevant to assess whether the claims under examination satisfy the criteria set forth in Article 33(1) PCT.

- 3 After amendment of claims 1 and 2 a clear delimitation is made in respect of stability of liquid status of the co-formulation, the set of claims meets the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-55 is new in the sense of Article 33(2) PCT with respect to D1. Some remaining adaption of the description can be proceeded in the respective European phase, if appropriate.
- 4 The present application meets the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject matter of claims 1 - 55 involves an inventive step in the sense of Article 33(3)PCT.
As far as the requirement of inventive step are concerned it would appear that a person skilled in this art confronted with the problem of providing liquid ready-for-use preparations of immune globuline and soluble hyaluronidase, being stable for long term use at storage conditions of 32°C, having a maintained hyaluronidase activity, would in principle have been able to deduce from the combined teaching of D1-D7, that a) lowering of aggregates of immune globuline could improve the storage properties of preparations comprising liquid immune globuline solutions and that b) such liquid solutions would preferably be at lower pH, in a region where typically digestion step of of mab takes place. However, the solution described, which resides in the lowering the pH between 4 and 5 in the presence of alkali metal salt chloride, seems to bear elements which do not belong to a routine work of the skilled person in this field. Moreover, the result achieved, which resides in an improved stability at 32°C over 6 month, is considered to be surprising.
- 5 Claims 44 to 55 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. Patentability, in particular novelty and inventive step, of the set of claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. In fact second medical use claims typically

000354

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2010/002545

require a specified information in respect of the illness to be concerned, the expression "IG-treatable disease or condition" is considered to be far to waste.

- 6 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in D1-D7 is not mentioned in the description, nor is this document identified therein.

000355

- 157 -

CLAIMS:

1. A stable composition formulated for subcutaneous administration,
wherein:
the stable composition is a liquid co-formulation;
5 the composition has a pH of between 4 or about 4 to between 5 or about 5,
inclusive; and
the composition comprises:
immune globulin (IG) at a concentration that is at least 10 % w/v;
a soluble hyaluronidase at a concentration that is at least 50 U/mL and is present
10 in an amount sufficient to allow for the subcutaneous administration of the composition at
a single injection site at an infusion rate equal to or greater than the intravenous infusion
rate for intravenous immunoglobulin; and
an alkali metal chloride salt at a concentration of at least 0.05 M,
whereby the co-formulation is stable at temperatures up to 32° C for at least 6 months.
- 15 2. A stable composition formulated for subcutaneous administration,
wherein:
the stable composition is a liquid co-formulation;
the composition has a pH of between 4 or about 4 to between 5 or about 5,
inclusive; and
20 the composition comprises:
immune globulin (IG) at a concentration that is at least 10 % w/v;
a soluble hyaluronidase at a concentration that is at least 50 U/mL and is present
at a ratio of at least 100 Units/gram (U/g) IG; and
an alkali metal chloride salt at a concentration of at least 0.05 M,
25 whereby the co-formulation is stable at temperatures up to 32° C for at least 6 months.
3. The stable, liquid co-formulation of claim 1 or claim 2, further comprising
an amino acid stabilizer in an amount that is at least 0.1 M.
4. The stable, liquid co-formulation of claim 3, wherein the amino acid
stabilizer is selected from among alanine, histidine, arginine, lysine, omithine, isoleucine,
30 valine, methionine, glycine and proline.
5. The stable, liquid co-formulation of claim 3 or claim 4, wherein the amino
acid stabilizer is glycine or proline.

000356

- 158 -

6. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-5, wherein the amino acid stabilizer is in an amount that is or is at least 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.45 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M or 0.75 M.

7. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-6, wherein the amino acid stabilizer is in an amount that is 0.25 M.

8. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-7, wherein the IG is at least 10 % w/v, 11 % w/v, 12 % w/v, 13 % w/v, 14 % w/v, 15 % w/v, 16 % w/v, 17 % w/v, 18 % w/v, 19 % w/v, 20 % w/v, 21 % w/v, 22 % w/v or more.

9. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-8, wherein the IG is between at or about 10 % w/v to at or about 20 % w/v.

10. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-9, wherein the IG is from human plasma.

11. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-10, wherein the IG is purified from human plasma by a purification method comprising alcohol fractionation.

12. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-11, wherein the IG is further purified by any one or more of a polyethylene glycol (PEG) precipitation, ion-exchange chromatography, enzymatic cleavage, diafiltration or ultrafiltration.

13. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-12, wherein the IG is subjected to a viral reduction step selected from among incubation at pH 4.0 with or without pepsin, solvent detergent treatment and nanofiltration.

14. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-13, wherein the IG contains IgG, IgA and IgM.

15. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-14, wherein the IG contains greater than 95 % IgG.

16. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-15, wherein the alkali metal chloride salt is selected from among KCl and NaCl.

17. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-16, wherein the alkali metal chloride salt is NaCl and the NaCl is at a concentration of 0.025 M, 0.03 M, 0.04 M, 0.05 M, 0.08 M, 0.09 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, or 0.25 M.

18. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-17, wherein the NaCl is at a concentration of 0.15 M.

000357

- 159 -

19. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-18, wherein the soluble hyaluronidase is a PH20, or a truncated form thereof.

20. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-19, wherein the PH20 is selected from an ovine, bovine or truncated human PH20.

5 21. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-20, wherein PH20 is a truncated human PH20 and the truncated human PH20 is selected from among polypeptides having a sequence of amino acids set forth in any of SEQ ID NOS:4-9, or allelic variants or other variants thereof.

10 22. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-21, wherein the soluble hyaluronidase is designated rHuPH20.

23. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-22, wherein the soluble hyaluronidase is at a concentration that is 50 U/mL, 100 U/mL, 200 U/mL, 300 U/mL, 400 U/mL, 500 U/ mL or more.

15 24. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-23, wherein the soluble hyaluronidase is at a concentration that is at or about 75 U/mL to at or about 350 U/mL.

25. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-24, wherein the soluble hyaluronidase is at a ratio of 100 U/g IG, 150 U/g IG, 200 U/g IG, 250 U/g IG, 300 U/g IG, 400 U/g IG, 500 U/g IG, 600 U/g IG, 700 U/g IG, 800 U/g IG, 900 U/g IG, 20 1000 U/g IG, 1200 U/g IG, 1500 U/g IG, 1800 U/g IG, 2000 U/g IG, 3000 U/g IG, 4000 U/g IG or 5000 U/g IG.

26. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-25, wherein the soluble hyaluronidase is at a ratio of 250 U/g, 500 U/g IG, 1000 U/g IG, 1500 U/g IG or 3000 U/g IG.

25 27. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-26 that has a pH of 4.4 to 4.9 in concentrated form.

28. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-27, wherein the co-formulation is for multiple dosage administration.

30 29. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-28, wherein the co-formulation is for single dosage administration.

000358

- 160 -

30. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-27 and claim 29, wherein the IG is in an amount sufficient for single dosage administration to treat an IG-treatable disease or condition.

5 31. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-27 and 29-30, wherein the amount of IG is in an amount sufficient for single dosage administration daily, weekly, biweekly, every 2-3 weeks, every 3-4 weeks or monthly for treatment of an IG-treatable disease or condition.

10 32. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-31, wherein the amount of IG in the co-formulation is substantially the same as the amount in a single dosage administration when administered intravenously for treatment of an IG-treatable disease or condition.

15 33. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-32, wherein the co-formulation is for single dosage administration and the amount of IG is or is about or at least 1 gram (g), 2 g, 3 g, 4 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g or 200g or is or about 1-200, 1-100, 10-100, 5-50, 6-50, 5-100 g.

20 34. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-33, wherein the co-formulation is for single dosage administration and the amount of hyaluronidase in the composition is or is about or at least 500 Units, 1000 Units, 2000 Units, 5000 Units, 10,000 Units, 30,000 Units, 40,000 Units, 50,000 Units, 60,000 Units, 70,000 Units, 80,000 Units, 90,000 Units, 100,000 Units or more.

35. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-34 that is stable at 28° C-32° C for 6 months, 7 months, 8 months, 9 months, 10 months, 11 months, 12 months or more.

25 36. The stable, liquid co-formulation of any of claims 1-35 that further is stable at 0° C-10° C for 6 months, 1 year, 2 years or more.

37. A kit, comprising the stable, liquid co-formulation of any of claims 1-36, and optionally instructions for use.

38. A container, comprising the stable, liquid co-formulation of any of claims 1-36.

30 39. A container of claim 38 that is a tube, bottle or vial.

40. A container of claim 38 that is a syringe.

000359

- 161 -

41. A container of any of claims 38-40, further comprising a needle for injection.

42. The container of any of claims 38-41, wherein the stable, liquid co-formulation is provided for single dosage administration or multiple dosage
5 administration.

43. A kit, comprising the container of any of claims 38-42, and a means for infusing the composition.

44. A method of treating an IG-treatable disease or condition, comprising subcutaneously administering to a subject the stable, liquid co-formulation of any of
10 claims 1-36.

45. The method of claim 44, wherein the co-formulation is administered such that the amount of IG administered is substantially the same as the amount when administered intravenously for treatment of an IG-treatable disease or condition.

46. The method of claims 44-45, wherein the IG-treatable disease or condition
15 is selected from among primary immune deficiency diseases, secondary immune deficiency diseases, inflammatory diseases, autoimmune diseases and acute infections.

47. The method of any of claims 44-46, wherein the IG-treatable disease or condition is a primary immune deficiency disease and the primary immune deficiency disease is selected from among common variable immunodeficiency (CVID), selective
20 IgA deficiency, IgG subclass deficiency, specific antibody deficiency, complement disorders, congenital agammaglobulinemia, ataxia telangiectasia, hyper IgM, Wiskott-Aldrich syndrome, severe combined immunodeficiency (SCID), primary hypogammaglobulinemia, primary immunodeficiency diseases with antibody deficiency, X-linked agammaglobulinemia (XLA), and hypogammaglobulinemia of infancy.

48. The method of any of claims 44-47, wherein the IG-treatable disease or condition is an acquired immune deficiency disease secondary to hematological malignancies and the hematological malignancy is selected from among chronic
25 lymphocytic leukemia (CLL), multiple myeloma (MM) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL).

49. The method of any of claims 44-48, wherein the IG-treatable disease or condition is an inflammatory or autoimmune disease and the inflammatory or autoimmune disease is selected from among Kawasaki's disease, chronic inflammatory
30

000360

- 162 -

demyelinating polyneuropathy, Guillain-Barre syndrome, idiopathic thrombocytopenic purpura, polymyositis, dermatomyositis, inclusion body myositis, Lambert-Eaton myasthenic syndrome, multifocal motor neuropathy, myasthenia gravis and Moersch-Woltman syndrome.

5 50. The method of any of claims 44-49, wherein the IG-treatable disease or condition is an acute bacterial, viral or fungal infection and the acute bacterial, viral or fungal infection is selected from among *Haemophilus influenzae* type B; *Pseudomonas aeruginosa* types A and B; *Staphylococcus aureus*; group B streptococcus; *Streptococcus pneumoniae* types 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, and 23; adenovirus types 2 and 5; 10 cytomegalovirus; Epstein-Barr virus VCA; hepatitis A virus; hepatitis B virus; herpes simplex virus-1; herpes simplex virus-2; influenza A; measles; parainfluenza types 1, 2 and 3; polio; varicella zoster virus; *Aspergillus*; and *Candida albicans*.

 51. The method of any of claims 44-50, wherein the IG-treatable disease or condition is selected from among iatrogenic immunodeficiency; acute disseminated 15 encephalomyelitis; ANCA-positive systemic necrotizing vasculitis; autoimmune haemolytic anaemia; bullous pemphigoid; cicatricial pemphigoid; Evans syndrome (including autoimmune haemolytic anaemia with immune thrombocytopenia); foeto-maternal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT/NAIT); haemophagocytic syndrome; high-risk allogeneic haemopoietic stem cell transplantation; IgM 20 paraproteinaemic neuropathy; kidney transplantation; multiple sclerosis; opsoclonus myoclonus ataxia; pemphigus foliaceus; pemphigus vulgaris; post-transfusion purpura; toxic epidermal necrolysis/Steven Johnson syndrome (TEN/SJS); toxic shock syndrome; Alzheimer's Disease; systemic lupus erythematosus; multiple myeloma; sepsis; B cell tumors; paraneoplastic cerebellar degeneration with no antibodies; and bone marrow 25 transplantation.

 52. Use of a stable, liquid co-formulation of any of claims 1-36 for formulation of a medicament for treating an IG-treatable disease or condition.

 53. The use of claim 52, wherein the IG-treatable disease or condition is selected from among primary immune deficiency diseases, secondary immune deficiency 30 diseases, inflammatory diseases, autoimmune diseases and acute infections.

 54. A stable, liquid co-formulation of any of claims 1-36 for use in treating an IG-treatable disease or condition.

000361

- 163 -

55. The stable, liquid co-formulation of claim 54, wherein the IG-treatable disease or condition is selected from among primary immune deficiency diseases, secondary immune deficiency diseases, inflammatory diseases, autoimmune diseases and acute infections.

5

000362

REIVINDICACIONES

1. Una composición estable formulada para administración subcutánea, en donde:

La composición estable es una co-formulación líquida;

La composición tiene un pH de entre 4 o cerca de 4, hasta entre 5 o cerca de 5, inclusive, y

La composición comprende:

Inmunoglobulina (IG) en una concentración que es al menos 10 % p/v;

Una hialuronidasa soluble en una concentración que es al menos 50 U/mL y está presente en una cantidad suficiente para permitir la administración subcutánea de la composición en un sitio de inyección único a una tasa de infusión igual que o mayor que la tasa de infusión intravenosa para la inmunoglobulina intravenosa; y

Una sal cloruro de metal alcalino en una concentración de al menos 0.05 M, por lo que la co-formulación es estable a temperaturas hasta DE 32° C por al menos 6 meses.

1

2. Una composición estable formulada para administración subcutánea, en donde:

La composición estable es una co-formulación líquida;

La composición tiene un pH de 4 o alrededor de 4 hasta 5 o alrededor de 5, inclusive, y

La composición comprende:

Inmunoglobulina (IG) en una concentración que es al menos 10 % p/v;

Una hialuronidasa soluble en una concentración que es al menos 50 U/mL y está presente en una relación de al menos 100 Unidades/gramo (U/g) de IG; y

Una sal cloruro de metal alcalino en una concentración de al menos 0.05 M, por

000363

lo que la co-formulación es estable a temperaturas hasta de 32 °C por lo menos 6 meses.

3. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un estabilizador de aminoácido en una cantidad que es al menos 0.1 M.

4. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 3, en donde el estabilizador de aminoácido se selecciona de alanina, histidina, arginina, lisina, ornitina, isoleucina, valina, metionina, glicina y prolina.

5. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el estabilizador de aminoácido es glicina o prolina.

2

6. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el estabilizador de aminoácido está en una cantidad que es, o es al menos 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.25M, 0.3M, 0.35M, 0.4M, 0.45 M, 0.5 M 0.6 M, 0.7M o 0.75M.

7. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el estabilizador de aminoácido está en una cantidad que es 0.25M.

8. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la IG está en al menos 10% p/v, 11% p/v, 12% p/v, 13% p/v, 14% p/v, 15% p/v, 16% p/v, 17% p/v, 18% p/v, 19% p/v, 20% p/v, 21% p/v, 22% p/v o más.

9. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la IG está en o cerca de 10% p/v hasta o cerca de 20% p/v

000364

10. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la IG es de plasma humano.

11. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la IG se purifica de plasma humano por un método de purificación que comprende fraccionamiento con alcohol.

12. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la IG además se purifica por uno o más de: precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía de intercambio iónico, ruptura enzimática, diafiltración o ultrafiltración.

13. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde La IG se somete a una etapa de reducción viral seleccionada de incubación a pH 4.0 con o sin pepsina, tratamiento con detergente solvente y nanofiltración.

3

14. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la IG contiene IgG, IgA e IgM.

15. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la IG contiene más del 95% de IgG.

16. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la sal cloruro de metal alcalino se selecciona entre KCl y NaCl.

17. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-16,

000365

en donde la sal cloruro de metal alcalino es NaCl y el NaCl está en una concentración de 0.025M, 0.03M, 0.04M, 0.05M, 0.08M, 0.09M, 0.1M, 0.15M, 0.2M o 0.25M.

18. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el NaCl está en una concentración de 0.15M.

19. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde la hialuronidasa soluble es PH20 o una forma truncada de ésta.

20. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 en donde la PH20 se selecciona de una PH20 ovina, bovina o humana truncada.

21. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la PH20 es una PH20 humana truncada y la PH20 humana truncada se selecciona de polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS:4-9, o variantes alélicas u otras variantes de las mismas.

22. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde la hialuronidasa soluble se designa como rHuPH20.

23. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la hialuronidasa soluble está en una concentración de 50U/mL, 100 U/mL, 200 U/mL 300 U/mL 400 U/mL, 500 U/mL, o más.

24. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la hialuronidasa soluble está en una concentración que es de, o cerca de 75 U/mL hasta de o cerca de 350 U/mL.

000366

25. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde la hialuronidasa soluble está en una relación de 100 U/g de IG, 150 U/g de IG, 200 U/g de IG, 250 U/g de IG, 300 U/g de IG, 400 U/g de IG, 500 U/g de IG 600 U/g de IG, 700 U/g de IG, 800 U/g de IG, 900 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1200 U/g de IG, 1500 U/g de IG, 1800 U/g de IG, 2000 U/g de IG, 3000 U/g de IG, 4000 U/g de IG o 5000 U/g IG.

26. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la hialuronidasa soluble está en una relación de 250 U/g, 500 U/g de IG, 1000 U/g de IG, 1500 U/g de IG o 3000 U/g de IG.

27. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que tiene un pH de 4.4 a 4.9 en forma concentrada.

5

28. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde la co-formulación es para administración por dosificación múltiple.

29. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 en donde la co-formulación es para administración por dosificación única.

30. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y la reivindicación 29 en donde la IG está en una cantidad suficiente para administración por dosificación única para tratar una enfermedad o condición tratable con IG.

31. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 29-30, en donde la cantidad de IG es una cantidad suficiente para administración por dosificación única diariamente, semanalmente, cada dos semanas, cada 2-3 semanas,

000367

cada 3-4 semanas o mensualmente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

32. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde la cantidad de IG en la co-formulación es sustancialmente la misma que la cantidad en una administración por dosificación única cuando se administra intravenosamente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

33. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde la co-formulación es para administración por dosificación única y la cantidad de IG es de, o cerca de, o al menos de 1 gramo (g), 2g, 3g, 4g, 5g, 10g, 20g, 30g, 40g, 50g, 60g, 70g, 80g, 90g, 100g o 200 g o es de, o cerca de, 1-200, 1-100, 10-100, 5-50, 6-50, 5-100g.

6

34. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde la co-formulación es para administración por dosificación única y la cantidad de hialuronidasa en la composición es de, o cerca de, o al menos de 500 Unidades, 1000 Unidades, 2000 Unidades, 5000 Unidades, 10000 Unidades, 30000 Unidades, 40000 Unidades, 50000 Unidades, 60000 Unidades, 70000 Unidades, 80000 Unidades, 90000 Unidades, 100000 Unidades o más.

35. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, que es estable entre 28°C - 32°C por seis meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más.

36. La co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-35, que además es estable entre 0°C-10 °C por 6 meses, 1 año, 2 años o más.

000368

37. Un kit, que comprende la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y opcionalmente instrucciones para el uso.
38. Un contenedor, que comprende la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36.
39. Un contenedor de la reivindicación 38 que es un tubo, un frasco o un vial.
40. Un contenedor de la reivindicación 38 que es una jeringa.
41. Un contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-40, que además comprende una aguja para inyección.
42. El contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-41, en donde se suministra la co-formulación líquida estable para administración por dosificación única o administración por dosificación múltiple.
43. Un kit que comprende el contenedor de cualquiera de las reivindicaciones 38-42, y un medio para la infusión de la composición.
44. Un método de tratamiento de una enfermedad o condición tratable con IG, que comprende administrar subcutáneamente a un individuo, la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36.
45. El método de la reivindicación 44, en donde la co-formulación se

administra de tal manera que la cantidad de IG administrada es sustancialmente la misma que la cantidad cuando se administra intravenosamente para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

46. El método de las reivindicaciones 44-45, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona de enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades auto-inmunes e infecciones agudas.

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad de inmunodeficiencia primaria y la enfermedad de inmunodeficiencia primaria se selecciona entre inmunodeficiencia variable común (CVID), deficiencia selectiva de IgA, deficiencia de la subclase IgG, deficiencia de anticuerpos específicos, desordenes de complemento, agammaglobulinemia congénita, ataxia telangiectasia, hiper-IgM, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia severa combinada (SCID), hipogammaglobulinemia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia primaria con deficiencia de anticuerpos, agammaglobulinemia unida a X (XLA) e hipogammaglobulinemia de la infancia.

48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad de inmunodeficiencia adquirida secundaria a malignidades hematológicas

000370

y la malignidad hematológica se selecciona entre leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de no-Hodgkins (NHL).

49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-48, en donde la condición o enfermedad tratable con IG es una enfermedad inflamatoria o autoinmune y la enfermedad inflamatoria o autoinmune se selecciona entre la enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain Barre, púrpura trombocitopénica idiopática, polimiositis, dermatomiositis, miositis de inclusión de cuerpo, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuropatía motora multifocal, miastenia gravis y síndrome de Moersch-Woltman.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-49, donde la condición o enfermedad tratable con IG es una infección aguda bacteriana, viral o por hongos, y la infección aguda bacteriana, viral o por hongos se selecciona entre *Haemophilus influenzae* tipo B; *Pseudomonas aeruginosa* tipos A y B; *Staphylococcus aureus*; streptococcus grupo B; *Streptococcus pneumoniae* tipos 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19 y 23; adenovirus tipos 2 y 5; citomegalovirus; virus de Epstein-Barr VCA; virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus 1 del herpes simple, virus 2 del herpes simple; influenza A; sarampión; parainfluenza tipos 1, 2 y 3; polio; virus zoster de la varicela; *Aspergillus*; y *Candida albicans*.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44-50, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre

000371

inmunodeficiencia iatrogénica; encefalomiелitis diseminada aguda; vasculitis necrotizante sistémica ANCA-POSITIVA; anemia hemolítica autoinmune; penfigoide bulosa, penfigoide cicatricial; síndrome de Evans (incluyendo anemia hemolítica auto-inmune con trombocitopenia inmune); trombocitopenia aloinmune feto-maternal/neonatal (FMAIT/NAIT); síndrome hemofagocítico; trasplante de células del tallo hematopoyético alogénico de alto riesgo, neuropatía paraproteinémica de IgM, trasplante de riñón; esclerosis múltiple; ataxia mioclónica, opsclónica; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; púrpura post-transfusión; necrolisis epidérmica tóxica/síndrome de Steven Johnson (TEN/SJS); síndrome de shock tóxico; enfermedad de Alzheimer; lupus eritematoso sistémico; mieloma múltiple; sepsis; tumores de células B; degeneración cerebelar paraneoplástica sin anticuerpos; y trasplante de la médula ósea.

10

52. Uso de la co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para la formulación de un medicamento para el tratamiento de una condición o enfermedad tratable con IG.

53. El uso de la reivindicación 52, en donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes e infecciones agudas.

54. Una co-formulación líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para uso en el tratamiento de una condición o

000372

enfermedad tratable con IG.

55. La co-formulación líquida estable de la reivindicación 54, donde la condición o enfermedad tratable con IG se selecciona entre enfermedades de inmunodeficiencia primaria, enfermedades de inmunodeficiencia secundaria, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes e infecciones agudas.

Box No. VIII (iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51 bis.1(a)(iii)):

in relation to this international application,

BAXTER HEALTHCARE S.A. and BAXTER INTERNATIONAL, INC. ARE entitled to claim priority of earlier application No. 61/277,045 filed in US on 17 September 2009 (17.09.09) by virtue of the following:

Assignments from

TESCHNER, Wolfgang, Gestettengasse 19/14, 1030 Wien, Austria;
SVATOS, Sonja, Kapellengasse 42, A-2414 Berg, Austria;
BRUCKSHWAIGER, Leopold, Herminengasse 5/14, A-1020 Wien, Austria;
WEBER, Alfred, Skraupstrasse 24/42/8/ 1210 Wien, Austria;
SCHWARZ, Hans-Peter, Pötzleinsdorfer Strasse 50/9/2; A-1180 Wien, Austria; and
LEI, Laura, 11452 Clarkson Road, Los Angeles, California 90046, USA

to **BAXTER HEALTHCARE S.A. and BAXTER INTERNATIONAL, INC.** dated 25 February 2010; 25 February 2010; 29 March 2010; 16 March 2010; 09 April 2010; and 05 February 2010, respectively

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iii)".

374



No. 12-060153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:55:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐