(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0047741**

(51)[2020.01] **C12N 9/26**

(13) **B**

(21) 1-2020-04232

(22) 09/12/2009

(62) 1-2011-01785

(86) PCT/US2009/006501 09/12/2009

(87) WO 2010/077297 08/07/2010

(30) 61/201,384 09/12/2008 US; 61/281,240 13/11/2009 US

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/09/2020 390A

(73) HALOZYME INC. (US)
11388 Sorrento Valley Road, San Diego, CA 92121, United States of America

(72) WEI, Ge (US); PANNEERSELVAM, Krishnasamy (US); FROST, Gregory, I. (US); BOOKBINDER, Louis (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HYALURONIDAZA PH20 BỊ CẮT CỤT TAN ĐƯỢC VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HYALURONIDAZA PH20 BỊ CẮT CỤT TAN ĐƯỢC NÀY

(21) 1-2020-04232

(57) Sáng chế đề cập đến hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được và axit nucleic mã hóa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được để điều trị tình trạng dư thừa glycosaminoglycan.

```
PH20 người      MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
PH20 tinh tinh  MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
                ************************************************************

PH20 người      LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
PH20 tinh tinh  LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
                ********************.***.**********************************

PH20 người      QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
PH20 tinh tinh  QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
                ************************************************************

PH20 người      LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
PH20 tinh tinh  LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
                ************************************************************

PH20 người      VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV 300
PH20 tinh tinh  VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPV 300
                *****************************************:******************

PH20 người      FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
PH20 tinh tinh  FVYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
                *.************************************************************

PH20 người      ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
PH20 tinh tinh  ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
                ************************************************************

PH20 người      PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI 480
PH20 tinh tinh  PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQI 480
                ************************************************************.**

PH20 người      FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISSVASL 509
PH20 tinh tinh  FYNASPSTLSATMFIDLCDLYLVPTSYLIL 510
                *************** :  *.*: .*   *
```

FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được và axit nucleic mã hóa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được để điều trị tình trạng dư thừa glycosaminoglycan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hyaluronan (axit hyaluronic; HA) là polypeptit được tìm thấy trong cơ chất ngoại bào của nhiều tế bào, đặc biệt là trong các mô liên kết mềm. HA cũng được tìm thấy chủ yếu ở da, sụn, và trong dịch hoạt dịch ở động vật có vú. Hyaluronan cũng là thành phần chính của thủy tinh thể của mắt. HA có vai trò trong nhiều quá trình sinh lý, như trong tính nội cân bằng nước và protein huyết tương (Laurent TC et al (1992) *FASEB J* 6: 2397-2404). Một số bệnh nhất định có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc sản xuất hyaluronan. Hyaluronidaza là enzym phân hủy hyaluronan. Bằng cách xúc tác HA, hyaluronidaza có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến sự tích lũy của HA hoặc các glycosaminoglycan khác. Ngoài ra, vì HA là thành phần chính của hàng rào kẽ, hyaluronidaza làm tăng khả năng thấm của mô và do vậy có thể được sử dụng để làm tăng sự phân tán và phân phối của các chất trị liệu. Nhiều hyaluronidaza khác nhau được sử dụng để trị liệu (*ví dụ* Hydase™, Vitrase™ và Wydase™), thường dùng làm chất phân tán và phân bố cùng với các chất trị liệu khác. Nhiều loại trong số này là dạng cừu hoặc bò, mà có thể sinh miễn dịch để điều trị cho người. Cần có các chế phẩm được cải thiện của hyaluronidaza mà có thể được sử dụng để điều trị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit PH20 tan được, bao gồm polypeptit PH20 kéo dài tan được (esPH20), và các chế phẩm. Polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này là protein tan được mà được cắt cụt ở đầu cùng C và bao gồm protein khuyết toàn bộ trình tự tín hiệu gắn neo GPI (ví dụ, được cắt cụt ở các vị trí axit amin từ 450 đến 490). Polypeptit PH20 tan được này còn bao gồm polypeptit PH20 kéo dài tan được mà vẫn có một hoặc nhiều gốc được định vị trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI của polypeptit PH20

kiểu dại chiều dài đầy đủ tương ứng. Cũng được đề xuất là các polypeptit PH20 được biến đổi khác chứa các phần cắt cụt ở đầu cùng C. Dạng đã khử glycosyl hóa một phần của polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit này cũng được đề xuất. Sáng chế còn mô tả các phương pháp điều trị sử dụng polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất các hyaluronidaza PH20 kéo dài tan được (esPH20) gần như tinh khiết được phân lập, mà có thể được glycosyl hóa tại vị trí N hoặc được glycosyl hóa một phần tại vị trí N. Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N chứa ít nhất gốc N-axetylglucosamin được liên kết với mỗi gốc trong số ít nhất hai gốc liên kết với N, như, ví dụ, các gốc axit amin 368 và 393 của SEQ ID NO:107 hoặc các gốc tương ứng với các gốc axit amin 368 và 393 của SEQ ID NO:107. Theo một số khía cạnh, polypeptit esPH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N chứa ít nhất hai gốc N-axetylglucosamin được liên kết với mỗi gốc trong số ít nhất hai gốc liên kết với N. Polypeptit esPH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể chứa đường mạch nhánh.

Sáng chế đề xuất polypeptit esPH20 mà có trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 60-63 và 102-104 hoặc biến thể alen hoặc biến thể loài của chúng. Sáng chế còn đề xuất các biến thể polypeptit esPH20 có độ tương đồng trình tự ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 60-63 và 102-104 và giữ lại ít nhất 30% hoạt tính hyaluronidaza của dạng chưa được biến đổi tương ứng hoặc của polypeptit mà được mã hóa bởi axit nucleic mà mã hóa polypeptit với các axit amin 36-482 của SEQ ID NO:107. Các polypeptit esPH20 này vẫn tan được và có hoạt tính trung tính. Trong một ví dụ, esPH20 này là esPH20 ở người, như esPH20 với trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 60-63 và 102-104, hoặc esPH20 của tinh tinh, như esPH20 với trình tự axit amin được nêu dưới dạng các axit amin 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 hoặc 36-498 của SEQ ID NO:197.

Sáng chế còn đề xuất polypeptit PH20 gần như tinh khiết. Các polypeptit PH20 này có thể có trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 55-63 và 64-95 hoặc biến thể alen hoặc biến thể loài của chúng. Trong các ví dụ khác, polypeptit PH20 là các biến thể có độ tương đồng trình tự ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 55-63 và 64-95, mà vẫn giữ ít nhất 30% hoạt tính hyaluronidaza của dạng chưa được biến đổi tương ứng hoặc của polypeptit mà được mã hóa bởi axit nucleic mà mã hóa polypeptit với axit amin 36-482 của SEQ ID NO:107. Các polypeptit PH20 này có hoạt tính trung tính.

Polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được glycosyl hóa tại vị trí N hoặc được glycosyl hóa một phần tại vị trí N. Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N chứa ít nhất gốc N-axetylglucosamin được liên kết với mỗi gốc trong số ít nhất hai gốc liên kết với N, như, ví dụ, các gốc axit amin 368 và 393 của SEQ ID NO:107 hoặc các gốc tương ứng với các gốc axit amin 368 và 393 của SEQ ID NO:107. Theo một số khía cạnh, polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N chứa ít nhất hai gốc N-axetylglucosamin được liên kết với mỗi gốc trong số ít nhất hai gốc liên kết với N. Polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể chứa đường mạch nhánh. Theo một số khía cạnh, polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này tan được, và có thể được chọn từ trong số các PH20 của người, tinh tinh, khỉ rhesus, khỉ cynomolgus, chuột, thỏ, chuột lang, bò hoặc cừu.

Polypeptit esPH20 và PH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được biến đổi bằng cách, ví dụ, sialyl hóa, albumin hóa, farnysyl hóa, carboxyl hóa, hydroxy hóa hoặc phosphoryl hóa. Theo một số khía cạnh, polypeptit esPH20 và PH20 được cải biến bằng polyme, như dextran hoặc PEG. Sáng chế còn đề xuất các thể liên hợp chứa polypeptit esPH20 hoặc PH20 này. Các thể liên hợp nêu làm ví dụ bao gồm các thể liên hợp trong đó esPH20 hoặc PH20 được liên hợp với miền multime hóa (như miền Fc), độc tố, chất đánh dấu phát hiện được hoặc thuốc.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa polypeptit esPH20 và PH20 được nêu trên đây và được đề xuất trong bản mô tả này. Các axit nucleic này bao gồm các axit nucleic mã hóa polypeptit esPH20 hoặc PH20 với các axit amin tương ứng với các axit amin 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 hoặc 36-497 của SEQ ID NO:107, và các axit nucleic mã hóa esPH20 với các axit amin tương ứng với các axit amin 36-

491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 hoặc 36-498 của SEQ ID NO:197. Sáng chế còn đề xuất vectơ chứa các axit nucleic này và tế bào chứa vectơ này, như tế bào CHO.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit esPH20 hoặc PH20 được nêu trong bản mô tả này. Trong một số ví dụ, chế phẩm này chứa nhiều polypeptit esPH20 hoặc PH20. Ví dụ, chế phẩm này có thể chứa nhiều polypeptit esPH20 mà được mã hóa bởi phân tử axit nucleic mã hóa các axit amin tương ứng với các axit amin 36-450, 36-451, 36-452, 36-453, 36-454, 36-455, 36-456, 36-457, 36-458, 36-459, 36-460, 36-461, 36-462, 36-463, 36-464, 36-465, 36-484, 36-485, 36-486, 36-487, 36-489, 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 hoặc 36-497 của SEQ ID NO:107, và phân tử axit nucleic mã hóa esPH20 với các axit amin tương ứng với các axit amin 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496, 36-497 hoặc 36-498 của SEQ ID NO:197. Trong một số ví dụ, chế phẩm này chứa polypeptit esPH20 hoặc PH20 được tiết ra từ tế bào CHO.

Chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể là dược phẩm. Trong một số ví dụ, chế phẩmnày chứa chất trị liệu bổ sung, mà có thể được bào chế với chế phẩm này hoặc trong chế phẩm riêng rẽ. Ví dụ về chất trị liệu có thể được bao gồm trong chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này là chất hóa trị liệu, chất giảm đau, chất kháng viêm, chất kháng khuẩn, chất diệt amip, chất diệt động vật nguyên sinh có chân mao, chất chống bệnh parkinson, chất chống bệnh sốt rét, chất chống động kinh, chất chống trầm cảm, chất chống viêm khớp, chất kháng nấm, chất chống tăng huyết áp, chất hạ sốt, chất chống vật ký sinh, chất chống dị ứng, chất dạng chất chủ vận alpha-adrenergic, chất phong bế alpha, chất gây mê, chất giãn phế quản, chất diệt sinh vật, chất diệt vi khuẩn, chất kìm hãm vi khuẩn, chất phong bế beta adrenergic, chất phong bế kênh canxi, thuốc tim mạch, thuốc tránh thai, thuốc làm thông mũi, thuốc lợi tiểu, thuốc giảm đau, chất chẩn đoán, chất điện giải, thuốc ngủ, chất hormon, chất tăng đường huyết, thuốc giảm căng cơ, chất co cơ, thuốc chữa mắt, chất tác dụng giống thần kinh đối giao cảm, chất tăng sức mạnh tinh thần, thuốc an thần, chất kích thích thần kinh giao cảm, thuốc an thần, chất điều trị tiết niệu, thuốc trị bệnh ở âm đạo, thuốc diệt virut, chất vitamin, chất kháng viêm không steroit, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, polypeptit, protein, axit nucleic, thuốc, phân tử hữu cơ và chất cảm ứng giấc ngủ. Trong các ví dụ

cụ thể, chất trị liệu này là kháng thể, globulin miễn dịch, bisphosphonat (như axit zolentronic), xytokin, chất hóa trị liệu hoặc insulin (như insulin tác động nhanh).

Các chất trị liệu khác mà có thể được bao gồm trong chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Acivicin; Aclarubicin; Acodazol; Acronin; Adozelesin; Aldesleukin; Alemtuzumab; Alitretinoin (Axit 9-Cis-Retinoic); Allopurinol; Altretamin; Alvocidib; Ambazon; Ambomyxin; Ametantron; Amifostin; Aminoglutethimit; Amsacrin; Anastrozol; Anaxiron; Ancitabin; Anthramyxin; Apaziquon; Argimesna; Arsenic Trioxit; Asparaginaza; Asperlin; Atrimustin; Azacitidin; Azetepa; Azotomyxin; Banoxantron; Batabulin; Batimastat; BCG Sống; Benaxibin; Bendamustin; Benzodepa; Bexaroten; Bevacizumab; Bicalutamit; Bietaserpin; Biricodars; Bisantren; Bisantren; Bisnafit Dimesylat; Bizelesin; Bleomyxin; Bortezomib; Brequinar; Bropirimin; Budotitan; Busulfan; Cactinomyxin; Calusteron; Canertinib; Capecitabin; Caracemit; Carbetimer; Carboplatin; Carboquon; Carmofur; Carmustin với Polifeprosan; Carmustin; Carubicin; Carzelesin; Cedefingol; Celecoxib; Cemadotin; Chlorambucil; Cioteronel, Cirolemyxin; Cisplatin; Cladribin; Clanfenur; Clofarabin; Crisnatol; Xyclophosphamit; Cytarabin liposom; Cytarabin; Dacarbazin; Dactinomyxin; Darbepoetin Alfa; Daunorubicin liposom; Daunorubicin/Daunomyxin; Daunorubicin; Decitabin; Denileukin Diftitox; Dexniguldipin; Dexonnaplatin; Dexrazoxan; Dezaguanin; Diaziquon; Dibrospidium; Dienogest; Dinalin; Disermolit; Docetaxel; Dofequidar; Doxifluridin; Doxorubicin liposom; Doxorubicin HCL; dung dịch tiêm Docorubicin HCL liposom; Doxorubicin; Droloxifen; Dromostanolon Propionat; Duazomyxin; Ecomustin; Edatrexat; Edotecarin; Eflornithin; Elacridar; Elinafit; Dung dịch Elliott's B; Elsamitrucin; Emitefur; Enloplatin; Enpromat; Enzastaurin; Epipropidin; Epirubicin; Epoetin alfa; Eptaloprost; Erbulozol; Esorubicin; Estramustin; Etanidazol; Etoglucid; Etoposit phosphat; Etoposit VP-16; Etoposit; Etoprin; Exemestan; Exisulind; Fadrozol; Fazarabin; Fenretinit; Filgrastim; Floxuridin; Fludarabin; Flouraxil; 5-flouraxil; Fluoxymesteon; Flurocitabin; Fosquidon; Fostriecin; Fostriecin; Fotretamin; Fulvestrant; Galarubicin; Galocitabin; Gemcitabin; Gemtuzumab/Ozogamicin; Geroquinol; Gimatecan; Gimeracil; Gloxazon; Glufosfamit; Goserelin axetat; Hydroxyure; Ibritumomab/ Tiuxetan; Idarubicin; Ifosfamit; Ilmofosin; Ilomastat; Imatinib mesylat; Imexon; Improsulfan; Indisulams; Inproquon; Interferon alfa-2a;

Interferon alfa-2b; Interferon Alfa; Interferon Beta; Interferon Gamas; Interferon; Interleukin-2 và các Interleukin khác (bao gồm Interleukin tái tổ hợp); Intoplixin; Iobenguan [131-I]; Iproplatin; Irinotecan; Irsogladin; Ixabepilon; Ketotrexat; L-Alanosin; Lanreotit; Lapatinib; Ledoxantron; Letrozol; Leucovorin; Leuprolit; Leuprorelin (Leuprorelit); Levamisol; Lexacalcitol; Liarozol; Lobaplatin; Lometrexol; Lomustin/CCNU; Lomustin; Lonafarnib; Losoxantron; Lurtotecan; Mafosfamit; Mannosulfan; Marimastat; Masoprocol; Maytansin; Mechloretamin; Mechlorethamin/Mù tạc nitơ; Megestrol axetat; Megestrol; Melengestrol; Melphalan; Melphalan; L-PAM; Menogaril; Mepitiostan; Mercaptopurin; 6-Mecaptopurin; Mesna; Metesind; Methotrexat; Methoxsalen; Metomidat; Metoprin; Meturedepa; Miboplatin; Miproxifen; Misonidazol; Mitindomit; Mitocarcin; Mitocromin; Mitoflaxon; Mitogillin; Mitoguazon; Mitomalcin; Mitomyxin C; Mitomyxin; Mitonafit; Mitoquidon; Mitosper; Mitotan; Mitoxantron; Mitozolomit; Mivobulin; Mizoribin; Mofaroten; Mopidamol; Mubritinib; Axit Mycophenolic; Nandrolon Phenpropionat; Nedaplatin; Nelzarabin; Nemorubicin; Nitracrin; Nocodazol; Nofetumomab; Nogalamyxin; Nolatrexed; Nortopixantron; Octreotit; Oprelvekin; Ormaplatin; Ortataxel; Oteraxil; Oxaliplatin; Oxisuran; Oxophenarsin; Paclitaxel; Pamidronat; Patubilon; Pegademaza; Pegaspargasza; Pegfilgrastim; Peldesin; Peliomyxin; Pelitrexol; Pemetrexed; Pentamustin; Pentostatin; Peplomyxin; Perfosfamit; Perifosin; Picoplatin; Pinafide; Pipobroman; Piposulfan; Pirfenidon; Piroxantron; Pixantron; Plevitrexed; Plicamycid Mithramyxin; Plicamyxin; Plomestan; Plomestan; Porfim natri; Porfime; Porfiromyxin; Prednimustin; Procarbazin; Propamidin; Prospidium; Pumitepa; Puromyxin; Pyrazofurin; Quinacrin; Ranimustin; Rasburicaza; Riboprin; Ritrosulfan; Rituximab; Rogletimit; Roquinimex; Rufocromomyxin; Sabarubicin; Safingol; Sargramostim; Satraplatin; Sebriplatin; Semustin; Simtrazen; Sizofiran; Sobuzoxan; Sorafenib; Sparfosat; Axit Sparfosic; Sparsomyxin; Spirogermanium; Spiromustin; Spiroplatin; Spiroplatin; Squalamine; Streptonigrin; Streptovarycin; Streptozocin; Sufosfamit; Sulofenur; Sunitinib Malat; 6-TG; Tacedinalin; đá Tal; Talisomyxin; Tallimustin; Tamoxifen; Tariquidar; Tauromustin; Tecogalan; Tegafur; Teloxantron; Temoporfin; Temozolomit; Teniposit/VM-26; Teniposit; Teroxiron; Testolacton; Thiamiprin; Thioguanin; Thiotepa; Tiamiprin; Tiazofurin; Tilomisol; Tilorons; Timcodar; Timonacic; Tirapazamin; Topixantron; Topotecan; Toremifen; Tositumomab;

Trabectedin (Ecteinascidin 743); Trastuzumab; Trestolon; Tretinoin/ATRA; Triciribin; Trilostan; Trimetrexat; Triplatin Tetranitrat; Triptorelin; Trofosfamit; Tubulozol; Ubenimex; Uraxil Mù tạc; Uredepa; Valrubicin; Valspodar; Vapreotit; Verteporfin; Vinblastin; Vincristin; Vindesin; Vinepidin; Vinflunin; Vinformit; Vinglycinat; Vinleucinol; Vinleurosin; Vinorelbin; Vinrosidin; Vintriptol; Vinzolidin; Vorozol; Xanthomyxin A (Guamexyclin); Zeniplatin; Zilascorb [2-H]; Zinostatin; Zoledronat; Zorubicin; và Zosuquidar.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan, trong đó đối tượng được sử dụng esPH20 hoặc PH20, hoặc chế phẩm chứa esPH20 hoặc PH20, được đề xuất và được nêu trong bản mô tả này. Sáng chế còn mô tả các phương pháp để điều trị tình trạng dư thừa glycosaminoglycan; để điều trị khối u; để điều trị tình trạng tích lũy glycosaminoglycan trong não; để điều trị rối loạn tim mạch; để điều trị rối loạn ở mắt; để điều trị bệnh phổi; để làm tăng tính thấm của các chất hóa trị liệu vào các khối u rắn; để điều trị cục mỡ tích tụ dưới da; hoặc để làm tăng độ sinh khả dụng của thuốc và các chất trị liệu khác. Các phương pháp này bao gồm cho đối tượng dùng loại bất kỳ trong số các polypeptit esPH20 hoặc PH20 hoặc chế phẩm được nêu trong bản mô tả này.

Polypeptit esPH20 và PH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng thay cho PH20 hyaluronidaza, một mình hoặc ở dạng kết hợp, trong phương pháp điều trị bất kỳ hoặc trị liệu kết hợp mà PH20 hyaluronidaza được sử dụng trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20040268425, US20050260186, và US20060104968; và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 và 12/386,222.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả sự căn trình tự axit amin của polypeptit PH20 của người (SEQ ID NO:107) và tinh tinh (SEQ ID NO:197) (được tiến hành sử dụng Chương trình căn trình tự ClustalW2). Các gốc axit amin của trình tự tín hiệu gắn neo GPI PH20 của người, và axit amin tương ứng trong trình tự PH20 của tinh tinh, được in đậm và gạch chân. "*" thể hiện rằng các gốc nêu trên là giống nhau ở cả hai trình tự trong sự căn trình tự. ":" thể hiện các phần thế bảo toàn, và "." thể hiện các phần thế bán bảo toàn.

Fig.2 mô tả các dạng chính của N-glycan ở động vật có xương sống, bao gồm manoza glycan bậc cao, glycan lai và glycan phức hợp.

Fig.3 mô tả vị trí cắt của endoglycosidaza. Fig.3A minh họa vị trí cắt đối với Endoglycosidaza F1 và Peptit N Glycosidaza F (PNGaseF). Fig.3B minh họa vị trí cắt đối với Endoglycosidaza F2 và PNGaseF. Fig.3C minh họa vị trí cắt đối với Endoglycosidaza F3 và PNGaseF. Fig.3D minh họa vị trí cắt đối với Endoglycosidaza F4 và PNGaseF.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tổng quan

A. Các định nghĩa

B. Tổng quan

1. PH20

a. Quá trình glycosyl hóa

b. Gắn neo GPI

C. Polypeptit PH20 kéo dài tan được

1. Polypeptit esPH20 của người

2. Polypeptit esPH20 của các loài khác

D. Polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N

1. Polypeptit PH20

2. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C

3. Các cải biến bổ sung

Sự liên hợp với polyme

E. Các phương pháp sản xuất axit nucleic mã hóa PH20 kéo dài tan được và các hyaluronidaza PH20tan được khác, và các polypeptit của chúng

1. Vectơ và tế bào

2. Sự biểu hiện

a. Tế bào sinh vật nhân sơ

b. Tế bào nấm men

c. Tế bào côn trùng

d. Tế bào động vật có vú

e. Thực vật

3. Các kỹ thuật tinh chế

F. Điều chế, bào chế và sử dụng polypeptit PH20 kéo dài tan được, và các polypeptit PH20 tan được khác

1. Các dạng tiêm được, dung dịch và nhũ tương

Bột được đông khô

2. Sử dụng tại chỗ

3. Chế phẩm cho các đường sử dụng khác

4. Liều lượng và cách dùng

5. Sự đóng gói, sản phẩm của quá trình sản xuất và kit

G. Thử nghiệm

1. Hoạt tính hyaluronidaza

2. Khả năng hòa tan

H. Các phương pháp điều trị và sử dụng PH20 kéo dài tan được và các PH20 tan được khác và trị liệu kết hợp

1. Sử dụng làm tác nhân phân bố và trị liệu kết hợp

2. Sử dụng để loại bỏ lượng glycosaminoglycanaza dư

a. Sử dụng trong điều trị bệnh ung thư

b. Sử dụng trong điều trị tình trạng tích lũy glycosaminoglycan ở não

c. Sử dụng trong điều trị tình trạng tích lũy glycosaminoglycan ở bệnh tim mạch

d. Sử dụng trong phẫu thuật cắt dịch kính và các tình trạng bệnh và rối loạn ở mắt

e. Sử dụng trong truyền dịch dưới da

f. Sử dụng trong liệu pháp gen

g. Sử dụng làm mỹ phẩm

h. Sử dụng trong cấy ghép cơ quan

i. Sử dụng trong bệnh phổi

3. Các sử dụng khác

I. Các ví dụ

A. Các định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như đã biết phổ biến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Trừ khi được lưu ý là khác, tất cả các patent, đơn yêu cầu cấp patent, các công bố đơn, trình tự Ngân hàng gen, cơ sở dữ liệu, trang web và các tài liệu được công bố khác được đề cập đến trong toàn bộ bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trong trường hợp có nhiều định nghĩa cho thuật ngữ ở đây, các định nghĩa trong phần này được sử dụng. Khi việc tham chiếu được thực hiện qua URL hoặc qua bộ định danh hoặc địa chỉ tương tự khác, cần hiểu rằng các bộ định danh này có thể thay đổi và thông tin cụ thể trên internet có thể đến và đi, nhưng thông tin tương đương có thể được tìm thấy bằng cách tra cứu trên internet. Việc tham chiếu đến các bộ định danh hoặc địa chỉ như vậy chứng minh tính sẵn có và tính phổ biến trong cộng đồng của các thông tin này.

Trong bản mô tả này, hyaluronidaza dùng để chỉ nhóm enzym mà phân hủy hyaluronan. Hyaluronidazabao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hyaluronidazacủa vi khuẩn (EC 4.2.2.1 hoặc EC 4.2.99.1), hyaluronidaza từ đỉa, các vật ký sinh, và loài giáp xác (EC 3.2.1.36), và hyaluronidaza thuộc loài động vật có vú (EC 3.2.1.35). Hyaluronidazabao gồm bất kỳ trong số các hyaluronidaza có nguồn gốc không phải từ người bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chuột, chó, mèo, thỏ, chim, bò, cừu, lợn, ngựa, cá, ếch, vi khuẩn, và bất kỳ từ đỉa, các vật ký sinh khác, và loài giáp xác. Hyaluronidaza của người nêu làm ví dụ bao gồm HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, và PH20 (SEQ ID NO:107). Cũng được bao gồm trong số các hyaluronidaza là hyaluronidaza tan được, bao gồm, PH20 của cừu và bò, PH20 tan được của người và rHuPH20. Ví dụ về hyaluronidazatan được của bò hoặc cừu có bán sẵn là Vitrase®hyaluronidaza (hyaluronidaza của cừu) và Amphadase®hyaluronidaza (hyaluronidaza của bò).

Trong bản mô tả này, PH20 dùng để chỉ loại hyaluronidaza xuất hiện trong tinh trùng và có hoạt tính trung tính. PH-20 xuất hiện trên bề mặt tinh trùng, và trong đầu tinh trùng có nguồn gốc từ lysosom, nơi mà nó được liên kết với màng đầu tinh trùng bên trong. PH20 bao gồm các PH20 có nguồn gốc bất kỳ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nguồn gốc từ người, tinh tinh, khỉ cynomolgus, khỉ Rhesus, chuột, bò, cừu, chuột lang, thỏ và chuột cống. Polypeptit PH20 nêu làm ví dụ bao gồm polypeptit PH20 từ người

(SEQ ID NO:107), tinh tinh (SEQ ID NO:197), khỉ Rhesus (SEQ ID NO:198), khỉ cynomolgus (SEQ ID NO:114), bò (ví dụ, SEQ ID NO:111 và 119); chuột nhắt (SEQ ID NO:117); chuột cống (SEQ ID NO:116); thỏ (SEQ ID NO:112); cừu (SEQ ID NO:113, 118 và 120) và chuột lang (SEQ ID NO:115). Viện dẫn đến PH20 bao gồm polypeptit PH20 tiền chất và polypeptit PH20 trưởng thành (như polypeptit trong đó trình tự tín hiệu được loại bỏ), dạng cắt cụt của chúng mà có hoạt tính, và bao gồm các biến thể alen và các biến thể loài, các biến thể được mã hóa bởi các biến thể ghép, và các biến thể khác, bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107 và 109, hoặc dạng trưởng thành của chúng. Polypeptit PH20 còn bao gồm polypeptit chứa các cải biến hóa học hoặc cải biến sau dịch mã và polypeptit không chứa các cải biến hóa học hoặc cải biến sau dịch mã. Các biến đổi như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, PEGyl hóa, albumin hóa, glycosyl hóa, farnesyl hóa, carboxyl hóa, hydroxyl hóa, phosphoryl hóa, và các cải biến polypeptit khác đã biết trong lĩnh vực. PH20 hyaluronidaza đã cắt cụt là dạng bất kỳ được làm ngắn ở đầu cùng C của chúng, cụ thể là các dạng mà được cắt cụt và có hoạt tính trung tính khi được glycosyl hóa tại vị trí N.

Trong bản mô tả này, PH20 tan được dùng để chỉ dạng bất kỳ của PH20 mà tan được trong các điều kiện sinh lý. PH20 tan được có thể được xác định, ví dụ, bởi sự phân bố của nó vào trong pha nước của dung dịch Triton® X-114 ở nhiệt độ 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7). PH20 bám màng, như PH20 bám lipit, bao gồm PH20 bám GPI, sẽ phân bố vào pha giàu chất tẩy rửa, nhưng sẽ phân bố vào pha nước hoặc pha ít chất tẩy rửa sau khi xử lý bằng Phospholipaza-C. Được bao gồm trong số các PH20 tan được là PH20 bám màng trong đó một hoặc nhiều vùng có liên quan đến việc bám của PH20 vào màng được loại bỏ hoặc được cải biến, trong đó dạng tan được vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza. PH20 tan được còn bao gồm PH20 tái tổ hợp tan được và PH20 được chứa trong hoặc được tinh chế từ các nguồn tự nhiên, như, ví dụ, dịch chiết tinh hoàn từ cừu hoặc bò. Ví dụ về PH20 tan được như vậy là PH20 tan được của người.

Trong bản mô tả này, PH20 tan được của người hoặc sHuPH20 bao gồm polypeptit PH20 thiếu tất cả hoặc một phần của trình tự bám glycosylphospatidylinositol (GPI) ở đầu cùng C sao cho sau khi biểu hiện, polypeptit này tan được trong điều kiện sinh lý.

Khả năng hòa tan có thể được đánh giá bởi phương pháp thích hợp bất kỳ mà chứng tỏ khả năng hòa tan trong các điều kiện sinh lý. Ví dụ về các phương pháp như vậy là thử nghiệm Triton® X-114, mà đánh giá sự phân bố vào pha nước và thử nghiệm được mô tả trên đây và ở phần ví dụ. Ngoài ra, polypeptit PH20 tan được của người, nếu được tạo ra ở tế bào CHO, như tế bào CHO-S, polypeptit mà được biểu hiện và được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, polypeptit PH20 tan được của người không bị giới hạn ở polypeptit được sản xuất ở tế bào CHO, mà có thể được sản xuất ở tế bào bất kỳ hoặc bằng phương pháp bất kỳ, bao gồm sự biểu hiện tái tổ hợp và sự tổng hợp polypeptit. Viện dẫn đến sự tiết ở tế bào CHO là có tính chất định nghĩa. Do vậy, nếu polypeptit có thể được biểu hiện và được tiết trong tế bào CHO và tan được, *tức là* phân bố vào pha nước khi được chiết bằng Triton® X-114, nó là polypeptit PH20 tan được cho dù nó có được tạo ra như vậy hay không. Polypeptit tiền chất đối với sHupolypeptit PH20 có thể bao gồm trình tự tín hiệu, như trình tự tín hiệu khác loại hoặc không khác loại (tức là tự nhiên). Ví dụ về các tiền chất này là các tiền chất bao gồm trình tự tín hiệu, như trình tự tín hiệu 35 axit amin tự nhiên ở các vị trí axit amin 1-35 (xem, ví dụ, axit amin 1-35 của SEQ ID NO:107).

Trong bản mô tả này, "PH20 tan được kéo dài" hoặc "esPH20" bao gồm polypeptit PH20 tan được chứa các gốc lên đến trình tự tín hiệu gắn neo GPI và một hoặc nhiều gốc kề nhau từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI sao cho esPH20 tan được trong điều kiện sinh lý. Khả năng hòa tan trong điều kiện sinh lý có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, nó có thể được đánh giá bởi thử nghiệm Triton® X-114 được mô tả trên đây và trong phần ví dụ. Ngoài ra, như được thảo luận trên đây, PH20 tan được, nếu được tạo ra ở tế bào CHO, như tế bào CHO-S, polypeptit mà được biểu hiện và được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, polypeptit PH20 tan được của người không bị giới hạn ở polypeptit PH20 được tạo ra ở tế bào CHO, mà có thể được tạo ra ở tế bào bất kỳ hoặc bằng phương pháp bất kỳ, bao gồm sự biểu hiện tái tổ hợp và sự tổng hợp polypeptit. Viện dẫn đến sự tiết trong tế bào CHO là có tính chất định nghĩa. Do vậy, nếu polypeptit có thể được biểu hiện và được tiết trong tế bào CHO và tan được, *tức là* phân bố vào pha nước khi được chiết bằng Triton® X-114, nó là polypeptit PH20 tan được cho dù nó có được tạo ra như vậy hay không. Polypeptit esPH20 tan được của người bao gồm, ngoài các gốc 36-490,

một hoặc nhiều axit amin kề nhau từ vị trí gốc axit amin 491 của SEQ ID NO:107, được bao gồm, sao cho polypeptit tạo ra là tan được. Polypeptit esPH20 tan được ở người nêu làm ví dụ là polypeptit có các gốc axit amin tương ứng với axit amin 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 và 36-497 của SEQ ID NO:107. Ví dụ về các polypeptit này là các polypeptit với trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO:60-63 và 102-104. Cũng được bao gồm là biến thể alen và các biến thể khác, như biến thể bất kỳ với độ tương đồng trình tự 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn với polypeptit tương ứng của SEQ ID NO: 60-63 và 102-104 mà vẫn giữ hoạt tính trung tính và tan được. Viện dẫn đến mức tương đồng trình tự đề cập đến các biến thể với phần thế axit amin.

Trong bản mô tả này, viện dẫn đến esPH20 bao gồm polypeptit esPH20 tiền chất và polypeptit esPH20 trưởng thành (như polypeptit trong đó trình tự tín hiệu được loại bỏ), dạng cắt cụt của chúng mà có hoạt tính enzym (giữ lại ít nhất 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% hoặc nhiều hơn của dạng có chiều dài đầy đủ) và tan được, và bao gồm các biến thể alen và các biến thể loài, các biến thể được mã hóa bởi các biến thể ghép, và các biến thể khác, bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107 và 109, hoặc dạng trưởng thành của chúng.

Trong bản mô tả này, viện dẫn đến esPH20 còn bao gồm các esPH20 chứa các cải biến hóa học hoặc sau dịch mã và các esPH20 không chứa các cải biến hóa học hoặc cải biến sau dịch mã. Các cải biến như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, PEGyl hóa, albumin hóa, glycosyl hóa, farnesyl hóa, carboxyl hóa, hydroxy hóa, phosphoryl hóa, và các cải biến polypeptit khác đã biết trong lĩnh vực.

Trong bản mô tả này, PH20 tái tổ hợp của người tan được (rHuPH20) dùng để chỉ dạng tan được của PH20 của người mà như được biểu hiện tái tổ hợp và được tiết trong tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). rHuPH20 tan được được mã hóa bởi axit nucleic mà bao gồm trình tự tín hiệu và được nêu trong SEQ ID NO:109. Cũng được bao gồm là phân tử ADN mà là biến thể alen của chúng và các biến thể tan được khác. Axit nucleic mã hóa rHuPH20 tan được được biểu hiện trong tế bào CHO mà tiết polypeptit trưởng thành. Như được tạo ra ở môi trường nuôi cấy, có sự không đồng nhất ở đầu cùng

C sao cho sản phẩm này bao gồm hỗn hợp của loài mà có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều trong số các SEQ ID NO:122 đến SEQ ID NO:127 với sự phong phú khác nhau.

Tương tự, đối với các dạng khác của PH20, như esPH20, polypeptit được biểu hiện tái tổ hợp và chế phẩm của chúng có thể bao gồm nhiều loài mà đầu cùng C của nó thể hiện sự không đồng nhất. Ví dụ, chế phẩm của esPH20 được biểu hiện tái tổ hợp được tạo ra bởi sự biểu hiện của polypeptit của SEQ ID NO:8, mà mã hoá esPH20 có các axit amin 36-497, có thể bao gồm các dạng có ít axit amin hơn, như 36-496, 36-495.

Trong bản mô tả này, gốc được liên kết với N dùng để chỉ gốc axit amin asparagin (N) của polypeptit mà có khả năng được glycosyl hóa bởi sự cải biến sau dịch mã của polypeptit. Gốc liên kết với N nêu làm ví dụ của PH20 của người bao gồm axit amin N82, N166, N235, N254, N368 và N393 của PH20 của người được nêu trong SEQ ID NO:107.

Trong bản mô tả này, polypeptit được glycosyl hóa tại vị trí N dùng để chỉ polypeptit PH20 hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa liên kết oligosacarit của ít nhất ba gốc axit amin được liên kết với N, ví dụ, gốc liên kết với N tương ứng với các gốc axit amin N235, N368 và N393 của SEQ ID NO:107. Polypeptit được glycosyl hóa tại vị trí N có thể bao gồm polypeptit trong đó ba, bốn, năm và lên đến toàn bộ các gốc liên kết với N được liên kết với oligosacarit. Oligosacarit được liên kết với N có thể bao gồm oligosacarit oligomanoza, phức hợp, lai hoặc được sulfat hóa, hoặc các oligosacarit và monosacarit khác.

Trong bản mô tả này, polypeptit được glycosyl hóa một phần tại vị trí N dùng để chỉ polypeptit tối thiểu chứa N-axetylglucosamin glycan được liên kết với ít nhất ba gốc liên kết với N. Polypeptit được glycosyl hóa một phần có thể bao gồm các dạng glycan khác nhau, bao gồm monosacarit, oligosacarit, và dạng đường mạch nhánh, bao gồm polypeptit được tạo thành bởi việc xử lý polypeptit bằng EndoH, EndoF1, EndoF2 và/hoặc EndoF3. Sự phân cắt các glycan bởi các enzym như vậy được mô tả, ví dụ, trên Fig.2.

Trong bản mô tả này, polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa dùng để chỉ polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này trong đó ít hơn toàn bộ các vị trí glycosyl hóa có thể có được glycosyl hóa. Sự khử glycosyl hóa có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách loại bỏ sự glycosyl hóa, bằng cách ngăn chặn nó, hoặc bằng cách cải biến

polypeptit để loại bỏ vị trí glycosyl hóa. Như được thể hiện trong bản mô tả này, các vị trí N-glycosyl hóa cụ thể không cần cho hoạt tính, trong khi đó các vị trí khác là cần cho hoạt tính.

Trong bản mô tả này, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan dùng để chỉ bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ trong đó mức hyaluronan được tăng cao là nguyên nhân, kết quả hoặc được quan sát ở bệnh hoặc tình trạng bệnh này. Bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan có liên quan đến sự biểu hiện hyaluronan tăng cao trong mô hoặc tế bào, áp suất dịch lỏng trong kẽ tăng, thể tích mạch giảm, và/hoặc hàm lượng nước trong mô tăng. Bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan có thể được điều trị bằng cách dùng chế phẩm chứa enzym phân hủy hyaluronan, như hyaluronidaza, ví dụ, hyaluronidaza tan được, một mình hoặc kết hợp với hoặc ngoài sự điều trị và/hoặc chất khác. Bệnh và tình trạng bệnh nêu làm ví dụ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư giàu hyaluronan, ví dụ, khối u, bao gồm các khối u rắn như ung thư giai đoạn muộn, ung thư di căn, ung thư chưa phân hóa, ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô tại chỗ (ISC), ung thư biểu mô tế bào có vảy (SCC), ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tụy, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư vú, ung thư ruột kết và các ung thư khác. Ngoài ra, ví dụ về các bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan là bệnh có liên quan đến áp suất chất lỏng trong kẽ cao, như bệnh có liên quan đến áp suất đĩa đệm, và bệnh phù, ví dụ, bệnh phù gây ra bởi sự cấy ghép cơ quan, đột quỵ, chấn thương não hoặc các tổn thương khác. Ví dụ về bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan bao gồm bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến áp suất chất lỏng trong kẽ cao, thể tích mạch giảm, và/hoặc hàm lượng nước trong mô tăng, bao gồm bệnh ung thư, áp suất đĩa đệm và bệnh phù. Trong một ví dụ, việc điều trị tình trạng bệnh, bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến hyaluronan bao gồm làm thuyên giảm, làm giảm, hoặc tác dụng có lợi khác đến một hoặc nhiều thông số về áp suất dịch lỏng trong kẽ tăng (IFP), thể tích mạch giảm, và hàm lượng nước trong mô tăng.

Trong bản mô tả này, thể liên hợp dùng để chỉ polypeptit PH20 tan được được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với một hoặc nhiều các polypeptit hoặc các gốc hóa học khác. Các thể liên hợp này bao gồm protein dung hợp, được sản xuất bởi các thể liên hợp hóa học và được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ khác nhờ đó ít nhất một polypeptit PH20 tan được được liên kết, trực tiếp hoặc gián tiếp với polypeptit hoặc gốc hóa học

khác để cho thể liên hợp giữ được hoạt tính hyaluronidaza. Ví dụ về các thể liên hợp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm polypeptit PH20 được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với miền multime hóa, như gốc Fc, độc tố, chất đánh dấu hoặc thuốc.

Trong bản mô tả này, protein dung hợp dùng để chỉ polypeptit được mã hóa bởi trình tự axit nucleic chứa trình tự mã hóa từ một phân tử axit nucleic và trình tự mã hóa từ phân tử axit nucleic khác trong đó trình tự mã hóa này là trong cùng khung đọc sao cho khi cấu trúc dung hợp được phiên mã và được dịch mã trong tế bào chủ, protein được tạo ra chứa hai protein này. Hai phân tử này có thể liền kề trong cấu trúc hoặc được phân tách bởi polypeptit cầu nối mà chứa, 1, 2, 3, hoặc nhiều hơn, nhưng thường ít hơn 10, 9, 8, 7, hoặc 6 axit amin. Sản phẩm protein được mã hóa bởi cấu trúc dung hợp được gọi là polypeptit dung hợp. Ví dụ về polypeptit dung hợp bao gồm thể dung hợp Fc.

Trong bản mô tả này, polyme được liên hợp với enzym phân hủy hyaluronan, như hyaluronidaza, dùng để chỉ polyme bất kỳ được liên kết cộng hóa trị hoặc được liên kết ổn định, trực tiếp hoặc thông qua cầu nối, với enzym phân hủy hyaluronan. Các polyme như vậy, thường làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các gốc sialic, Các gốc PEGyl hóa, dextran, và đường và các gốc khác, như các gốc để glycosyl hóa.

Trong bản mô tả này, hoạt tính dùng để chỉ hoạt tính chức năng hoặc hoạt tính của polypeptit hoặc một phần của chúng có liên quan đến protein chiều dài đầy đủ (hoàn chỉnh). Hoạt tính chức năng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hoạt tính sinh học, hoạt tính xúc tác hoặc enzym, khả năng sinh kháng nguyên (khả năng liên kết hoặc cạnh tranh với polypeptit để liên kết với kháng thể kháng polypeptit), khả năng sinh miễn dịch, khả năng tạo thành các multime, và khả năng liên kết đặc hiệu với thụ thể hoặc phối tử đối với polypeptit.

Trong bản mô tả này, hoạt tính hyaluronidaza dùng để chỉ khả năng xúc tác như enzym sự phân cắt của axit hyaluronic. Thử nghiệm United States Pharmacopeia (USP) XXII về hyaluronidaza xác định một cách gián tiếp hoạt tính hyaluronidaza bằng cách đo lượng axit hyaluronic phân tử lượng cao hơn, hoặc hyaluronan, cơ chất (HA) còn lại sau khi enzym được cho phép phản ứng với HA trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Dung dịch chuẩn tham chiếu có thể được sử dụng trong thử nghiệm để xác định hoạt tính

tương đối, tính bằng đơn vị, của hyaluronidaza bất kỳ. Thử nghiệm *in vitro* để xác định hoạt tính hyaluronidaza của các hyaluronidaza, như PH20, bao gồm PH20 tan được và esPH20, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được nêu trong bản mô tả này. Các thử nghiệm nêu làm ví dụ bao gồm thử nghiệm vi độ đục được mô tả dưới đây (xem, chẳng hạn, Ví dụ 12), thử nghiệm này xác định một cách gián tiếp sự phân cắt của axit hyaluronic bởi hyaluronidaza bằng cách phát hiện chất kết tủa không tan được tạo thành khi axit hyaluronic chưa bị phân cắt liên kết với albumin huyết thanh. Các chuẩn tham chiếu có thể được sử dụng, ví dụ, để tạo ra đường cong chuẩn để xác định hoạt tính tính bằng đơn vị của hyaluronidaza được thử nghiệm.

Trong bản mô tả này, hoạt tính trung tính dùng để chỉ khả năng của polypeptit PH20 để xúc tác như enzym sự phân cắt của axit hyaluronic ở độ pH trung tính. PH20 có hoạt tính trung tính được cắt cụt ở đầu cùng C hoặc được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này có hoạt tính bằng hoặc khoảng 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza của PH20 có hoạt tính trung tính tương ứng mà không được cắt cụt ở đầu cùng C hoặc không được glycosyl hóa một phần tại vị trí N.

Trong bản mô tả này, trình tự tín hiệu gắn neo GPI là trình tự đầu cùng C của axit amin mà điều khiển sự bổ sung neo GPI được tạo thành trước vào polypeptit trong lòng ống của ER. Trình tự tín hiệu gắn neo GPI có mặt trong polypeptit tiền chất của polypeptit được gắn neo GPI, như polypeptit PH20 được gắn neo GPI. Trình tự tín hiệu gắn neo GPI đầu cùng C thường chứa vùng chủ yếu kỵ nước gồm 8-20 axit amin, được đặt trước bởi vùng đệm ưa nước gồm 8-12 axit amin, ngay phía dưới của vị trí ω, hoặc vị trí gắn neo GPI. Trình tự tín hiệu gắn neo GPI có thể được nhận dạng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các phương pháp và thuật toán *in silico* (xem, ví dụ Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582, Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758, Kronegg và Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (Neo GPI) in protein (DGPI)", ví dụ, trang web 129.194.185.165/dgpi/, Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni et al., (2008) BMC Bioinformatics 9:392), kể cả các phương pháp có sẵn trên

trang web tin sinh, như trang công cụ ExPASy Proteomics (ví dụ, trang web www.expasy.ch/tools/).

Trong bản mô tả này, polypeptit được bifucosyl hóa dùng để chỉ polypeptit mà có hai gốc fucoza, một gốc có mối liên kết α1,3 và gốc còn lại có mối liên kết α1,6, được liên kết với cùng gốc lõi N-axetylglucosamin, với gốc N-axetylglucosamin được liên kết với gốc asparagin trong mạch polypeptit. Polypeptit được bifucosyl hóa thường được tạo ra trong tế bào côn trùng.

Trong bản mô tả này, axit nucleic bao gồm ADN, ARN và dạng tương tự của chúng, bao gồm axit nucleic peptit (PNA) và hỗn hợp của chúng. Axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Khi đề cập đến mẫu dò hoặc đoạn mồi, mà tùy ý được đánh dấu, như bằng chất đánh dấu phát hiện được, như huỳnh quang hoặc chất đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, phân tử sợi đơn được dự tính. Các phân tử này thường có chiều dài sao cho đích của chúng là duy nhất về mặt thống kê hoặc có số lượng bản sao thấp (thường ít hơn 5, thường ít hơn 3) để dò hoặc mồi thư viện. Nhìn chung, mẫu dò hoặc đoạn mồi chứa ít nhất 14, 16 hoặc 30 nucleotit kề nhau của trình tự bổ sung với hoặc giống với gen quan tâm. Mẫu dò và đoạn mồi có thể có chiều dài là 10, 20, 30, 50, 100 hoặc hơn 100 axit nucleic.

Trong bản mô tả này, peptit dùng để chỉ polypeptit có chiều dài lớn hơn hoặc bằng 2 axit amin, và có chiều dài ít hơn hoặc bằng 40 axit amin.

Trong bản mô tả này, axit amin xuất hiện trong các trình tự axit amin khác nhau được đề xuất trong bản mô tả này được xác định theo chữ viết tắt ba chữ cái hoặc một chữ cái đã biết của chúng (Bảng 1). Nucleotit mà xuất hiện trong nhiều mảnh axit nucleic khác nhau được ký hiệu bằng các ký hiệu một chữ cái chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong bản mô tả này, "axit amin" là hợp chất hữu cơ chứa nhóm amino và nhóm axit carboxylic. Polypeptit chứa hai hoặc nhiều axit amin. Đối với các mục đích trong bản mô tả này, các axit amin bao gồm hai mươi axit amin xuất hiện tự nhiên, các axit amin không xuất hiện tự nhiên và các dạng tương tự axit amin (tức là, các axit amin trong đó α-cacbon có mạch bên).

Trong bản mô tả này, "gốc axit amin" dùng để chỉ axit amin được tạo thành khi phân hủy hóa học (thủy phân) polypeptit ở các mối liên kết peptit của nó. Các gốc axit amin được nêu trong bản mô tả này được cho là ở dạng đồng phân "L". Các gốc ở dạng đồng phân "D", mà cũng được định rõ, có thể được thế cho các gốc axit amin L bất kỳ miễn là tính chất chức năng mong muốn được giữ lại bởi polypeptit. NH_2 chỉ nhóm amino tự do có mặt tại đầu cùng amino của polypeptit. COOH chỉ nhóm carboxy tự do có mặt tại đầu cùng carboxyl của polypeptit. Để phù hợp với danh pháp polypeptit chuẩn được nêu trong tài liệu *J. Biol. Chem.*, 243: 3557-3559 (1968), và được chấp nhận trong tài liệu 37 C.F.R. §§ 1.821 -1.822, các ký hiệu viết tắt cho các gốc axit amin được trình bày trong Bảng 1:

Bảng 1 – Bảng tương ứng

Ký hiệu		
1Chữ cái	3Chữ cái	AXIT AMIN
Y	Tyr	Tyrosin
G	Gly	Glyxin
F	Phe	Phenylalanin
M	Met	Methionin
A	Ala	Alanin
S	Ser	Serin
I	Ile	Isoleuxin
L	Leu	Leuxin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
P	Pro	Prolin
K	Lys	Lysin
H	His	histidin
Q	Gln	Glutamin

Ký hiệu		
1Chữ cái	3Chữ cái	AXIT AMIN
E	Glu	Axit glutamic
Z	Glx	Glu và/hoặc Gln
W	Trp	Tryptophan
R	Arg	Arginin
D	Asp	Axit aspartic
N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asn và/hoặc Asp
C	Cys	Xystein
X	Xaa	Chưa biết hoặc các axit amin khác

Tất cả các trình tự gốc axit amin được biểu thị ở đây bởi các công thức có sự định hướng từ trái sang phải theo hướng thông thường từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxyl. Ngoài ra, cụm từ "gốc axit amin" được định nghĩa là bao gồm các axit amin được liệt kê trong Bảng tương ứng (Bảng 1) và các axit amin được cải biến và không thông thường, như các axit amin được đề cập đến trong tài liệu 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, và được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Ngoài ra, cần lưu ý rằng nét gạch ngang ở đầu hoặc cuối của trình tự gốc axit amin thể hiện liên kết peptit với trình tự khác của một hoặc nhiều gốc axit amin, với nhóm đầu cùng amino như NH_2 hoặc với nhóm đầu cùng carboxyl như COOH.

Trong bản mô tả này, "α-axit amin xuất hiện tự nhiên" là các gốc của 20 α-axit amin xuất hiện tự nhiên được kết hợp vào protein bởi sự nhận biết đặc hiệu của phân tử tARN tích điện với codon mARN cùng nguồn gốc của nó ở người. Axit amin không xuất hiện tự nhiên theo đó bao gồm, ví dụ, axit amin hoặc dạng tương tự của axit amin khác 20 axit amin xuất hiện tự nhiên và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, D-isostereome của axit amin. Axit amin không xuất hiện tự nhiên nêu làm ví dụ được mô tả ở đây và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong bản mô tả này, cấu trúc ADN là phân tử ADN sợi đơn hoặc sợi kép, mạch thẳng hoặc mạch vòng chứa các đoạn ADNđược kết hợp và được đặt cạnh nhau theo cách không được tìm thấy trong tự nhiên. Các cấu trúc ADN tồn tại là kết quả của thao tác của con người, và bao gồm dòng vô tính và các bản sao khác của các phân tử được thao tác.

Trong bản mô tả này, đoạn ADN là một phần của phân tử ADN lớn hơn có các thuộc tính xác định. Ví dụ, đoạn ADN mã hóa polypeptit xác định là một phần của phân tử ADN dài hơn, như plasmit hoặc mảnh plasmit, mà, khi đọc theo chiều từ 5' đến 3', sẽ mã hóa trình tự axit amin của polypeptit xác định này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ polynucleotit có nghĩa là polyme sợi đơn hoặc sợi kép của bazơ deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit được đọc từ đầu 5' đến đầu 3'. Polynucleotit bao gồm ARN và ADN, và có thể được phân lập từ các nguồn tự nhiên, được tổng hợp *in vitro*, hoặc được điều chế từ sự kết hợp của các phân tử tự nhiên và tổng hợp. Chiều dài của phân tử polynucleotit được nêu trong bản mô tả này là theo nucleotit (được viết tắt là "nt") hoặc cặp bazơ (được viết tắt là "bp"). Thuật ngữ nucleotit được sử dụng cho phân tử sợi đơn và sợi kép khi ngữ cảnh cho phép. Khi thuật ngữ được sử dụng cho các phân tử sợi kép, thuật ngữ này được sử dụng để biểu thị toàn bộ chiều dài và sẽ được hiểu là tương đương với thuật ngữ cặp bazơ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy rằng hai sợi của polynucleotit sợi kép có thể khác nhau không đáng kể về chiều dài và các đầu của chúng có thể được đặt so le; do đó tất cả các nucleotit trong phân tử polynucleotit sợi kép có thể không được bắt cặp. Thông thường, các đầu không bắt cặp này sẽ có chiều dài không vượt quá 20 nucleotit.

Trong bản mô tả này, "độ tương tự" giữa hai protein hoặc axit nucleic chỉ mối liên quan giữa trình tự axit amin của các protein hoặc trình tự nucleotit của các axit nucleic. Độ tương tự có thể dựa trên mức độ của độ đồng nhất và/hoặc tương đồng trình tự của các gốc và các gốc được chứa trong đó. Các phương pháp đánh giá mức độ tương tự giữa các protein hoặc các axit nucleic là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, trong một phương pháp đánh giá độ tương tự trình tự, hai trình tự axit amin hoặc nucleotit được căn trình tự theo cách đạt được mức tối đa của độ tương đồng giữa các trình tự. "Độ tương đồng" chỉ mức độ mà các trình tự axit amin hoặc nucleotit là bất biến. Việc căn trình tự axit amin, và đến mức độ nào đó là các trình tự nucleotit, cũng có thể xem xét đến các khác biệt bảo thủ và/hoặc các phần thế thường có

trong các axit amin (hoặc nucleotit). Các khác biệt bảo thủ là các khác biệt mà bảo tồn các tính chất lý hoá của các gốc có liên quan. Việc căn trình tự có thể là toàn diện (căn trình tự của các trình tự được so sánh trên toàn bộ chiều dài của trình tự và bao gồm tất cả các gốc) hoặc cục bộ (căn trình tự một phần của các trình tự chỉ bao gồm vùng hoặc các vùng tương tự nhất).

"Độ tương đồng" về bản chất có nghĩa được công nhận trong tình trạng kỹ thuật và có thể được tính bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã công bố. (Xem, ví dụ: 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; và Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Dù có nhiều phương pháp xác định độ tương đồng giữa hai polynucleotit hoặc polypeptit, thuật ngữ "độ tương đồng" là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math *48*:1073 (1988)).

Trong bản mô tả này, tương đồng (liên quan đến trình tự axit nucleic và/hoặc trình tự axit amin) có nghĩa là độ tương đồng trình tự khoảng lớn hơn hoặc bằng 25%, thường độ tương đồng trình tự lớn hơn hoặc bằng 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% hoặc 95%; tỷ lệ phần trăm chính xác có thể được định rõ nếu cần. Đối với các mục đích trong bản mô tả này, thuật ngữ "độ tương đồng" và "độ đồng nhất" thường được sử dụng thay thế lẫn nhau, trừ khi được thể hiện theo cách khác. Thông thường, để xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng hoặc độ đồng nhất, các trình tự được căn trình tự sao cho thu được sự ghép đôi bậc cao nhất (xem, ví dụ: 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., và Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; và Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math *48*:1073). Nhờ độ tương đồng trình tự, số lượng axit amin bảo toàn được xác định bằng chương

trình thuật toán căn trình tự tiêu chuẩn, và có thể được sử dụng với các điểm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi mỗi nhà cung cấp. Các phân tử axit nucleic về cơ bản tương đồng sẽ thường lai ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình hoặc ở điều kiện nghiêm ngặt cao dọc theo toàn bộ chiều dài của axit nucleic quan tâm. Cũng được đề xuất là phân tử axit nucleic chứa các codon thoái hoá thay cho các codon trong phân tử axit nucleic lai.

Hai phân tử bất kỳ có trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin "đồng nhất" hoặc "tương đồng" ít nhất là 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán trên máy tính đã biết như chương trình "FASTA", sử dụng, ví dụ, các thông số mặc định như trong tài liệu Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*:2444 (các chương trình khác bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al., Nucleic Acids Research 12(I)*:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al., J Molec Biol 215*:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math 48*:1073). Ví dụ, chức năng BLAST của cơ sở dữ liệu National Center for Biotechnology Information có thể được sử dụng để xác định độ đồng nhất. Chương trình có bán sẵn hoặc có sẵn công khai khác bao gồm, chương trình DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) và chương trình "Gap" (Madison WI) của University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG). Phần trăm độ tương đồng hoặc độ đồng nhất của protein và/hoặc phân tử axit nucleic có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP (ví dụ như Kimman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, được điều chỉnh bởi Smith and Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). Một cách tóm tắt, chương trình GAP xác định độ tương tự là số lượng các ký tự được căn trình tự (tức là, các nucleotit hoặc axit amin), mà tương tự nhau, chia cho tổng số lượng các ký tự trong trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự này. Các thông số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh đơn nguyên (bao gồm giá trị là 1 cho sự đồng nhất và 0 cho sự không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số được nêu trong tài liệu Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, như được mô tả trong tài liệu Schwartz and Dayhoff, eds., *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) điểm phạt là 3,0 cho mỗi khoảng trống và điểm phạt bổ sung là 0,10

cho mỗi ký tự trong mỗi khoảng trống; và (3) không có điểm phạt cho các khoảng trống cuối cùng.

Do đó, trong bản mô tả này, thuật ngữ "độ đồng nhất" hoặc "độ tương đồng" biểu thị sự so sánh giữa polypeptit hoặc polynucleotit thử nghiệm và polypeptit hoặc polynucleotit tham chiếu. Trong bản mô tả này, thuật ngữ ít nhất "tương đồng 90% với" chỉ phần trăm độ tương đồng là từ 90 đến 99,99 so với trình tự axit nucleic hoặc axit amin tham chiếu của polypeptit. Độ tương đồng ở mức 90% hoặc hơn thể hiện rằng, giả sử nhằm mục đích minh hoạ, chiều dài của polypeptit thử nghiệm và polypeptit tham chiếu là 100 axit amin được so sánh. Không nhiều hơn 10% (tức là, 10 trong số 100) số axit amin trong polypeptit thử nghiệm khác với các axit amin của polypeptit tham chiếu. Các so sánh tương tự có thể được thực hiện giữa polynucleotit thử nghiệm và polynucleotit tham chiếu. Phần khác nhau này có thể được thể hiện dưới dạng các đột biến điểm phân bố ngẫu nhiên trên toàn bộ chiều dài của polypeptit hoặc chúng có thể được nhóm lại trong một hoặc nhiều vị trí của chiều dài thay đổi lên tới cực đại cho phép, ví dụ như độ khác nhau10/100 axit amin (độ tương đồng khoảng 90%). Độ khác nhau được xác định là sự thế, sự chèn hoặc sự loại bỏ axit nucleic hoặc axit amin. Ở mức độ tương đồng hoặc đồng nhất là trên khoảng 85-90%, kết quả có thể độc lập với chương trình và các thông số khoảng trống được thiết lập; mức độ tương đồng cao như vậy có thể được đánh giá dễ dàng, thường bằng cách căn trình tự thủ công mà không cần dựa vào phần mềm.

Trong bản mô tả này, trình tự được căn trình tự để chỉ việc sử dụng độ tương đồng (độ tương tự và/hoặc độ đồng nhất) để căn trình tự các vị trí tương ứng trong trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin. Thông thường, hai hoặc nhiều trình tự mà có liên quan bởi độ tương đồng là 50% hoặc lớn hơn được căn trình tự. Tập hợp trình tự được căn trình tự chỉ 2 hoặc nhiều trình tự được căn trình tự ở các vị trí tương ứng và có thể bao gồm các trình tự căn trình tự có nguồn gốc từ ARN, như EST và các cADN khác, được căn trình tự với trình tự ADN hệ gen.

Trong bản mô tả này, "đoạn mồi" để chỉ phân tử axit nucleic có thể đóng vai trò làm điểm khởi động sự tổng hợp ADN được điều khiển bởi khuôn trong các điều kiện thích hợp (ví dụ, trong điều kiện có mặt bốn nucleosit triphosphat khác nhau và các chất polyme hóa như ADN polymeraza, ARN polymeraza hoặc transcriptaza ngược) trong đệm thích hợp và ở nhiệt độ thích hợp. Ưu tiên nếu phân tử axit nucleic nhất định có thể

đóng vai trò làm "mẫu dò" và làm "đoạn mồi." Tuy nhiên, đoạn mồi có nhóm 3' hydroxyl để kéo dài. Đoạn mồi có thể được sử dụng trong nhiều phương pháp khác nhau, bao gồm, ví dụ, phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), PCR transcriptaza đảo (RT), PCR ARN, LCR, PCR đa hợp, PCR tạo cấu trúc cán xoong, PCR bắt giữ, PCR biểu hiện, RACE đầu 3' và 5', PCR tại chỗ, PCR được điều hòa thông qua phản ứng nối và các quy trình khuếch đại khác.

Trong bản mô tả này, "cặp mồi" để chỉ tập hợp các đoạn mồi bao gồm đoạn mồi 5' (mồi ngược) mà lai với đầu 5' của trình tự cần khuếch đại (ví dụ, bằng phương pháp PCR) và đoạn mồi 3' (mồi xuôi) mà lai với phần bổ sung của đầu 3' của trình tự cần khuếch đại.

Trong bản mô tả này, "lai đặc hiệu" để chỉ việc gắn, bằng cách bắt cặp bazơ bổ sung, của phân tử axit nucleic (ví dụ như oligonucleotit) với phân tử axit nucleic đích. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết rõ các thông số *in vitro* và *in vivo* mà ảnh hưởng đến việc lai đặc hiệu, như chiều dài và thành phần của phân tử cụ thể. Các thông số đặc biệt liên quan đến việc lai *in vitro* còn bao gồm nhiệt độ gắn và rửa, chế phẩm đệm và nồng độ muối. Điều kiện rửa làm ví dụ để loại bỏ các phân tử axit nucleic không được liên kết đặc hiệu ở mức độ nghiêm ngặt cao là 0,1 x SSPE, SDS 0,1%, 65°C, và ở mức độ nghiêm ngặt trung bình là 0,2 x SSPE, SDS 0,1%, 50°C. Điều kiện nghiêm ngặt tương đương được biết trong lĩnh vực. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng điều chỉnh các thông số này để đạt được việc lai đặc hiệu phân tử axit nucleic với phân tử axit nucleic đích thích hợp cho ứng dụng cụ thể. Thuật ngữ bổ sung, khi đề cập đến hai trình tự nucleotit, có nghĩa là hai trình tự nucleotit này có khả năng lai, thường là với ít hơn 25%, 15% hoặc 5% sự không khớp giữa các nucleotit đối diện. Nếu cần, tỷ lệ phần trăm bổ sung sẽ được định rõ. Thông thường, hai phân tử được chọn sao cho chúng sẽ lai trong điều kiện nghiêm ngặt cao.

Trong bản mô tả này, về cơ bản giống với sản phẩm có nghĩa là tương tự đủ để tính chất quan tâm không bị thay đổi đáng kể sao cho sản phẩm về cơ bản giống này có thể được sử dụng thay cho sản phẩm.

Trong bản mô tả này, cũng cần hiểu rằng thuật ngữ "về cơ bản giống" hoặc "về cơ bản tương tự" thay đổi theo ngữ cảnh như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Trong bản mô tả này, biến thể alen hoặc sự biến đổi alen để chỉ dạng thay thế bất kỳ trong số hai hoặc nhiều dạng thay thế của gen chiếm đóng cùng locut nhiễm sắc thể. Sự biến đổi alen xảy ra một cách tự nhiên thông qua đột biến, và có thể gây ra hiện tượng đa hình trong quần thể. Các đột biến gen có thể là câm (không có thay đổi trong polypeptit được mã hoá) hoặc có thể mã hoá polypeptit có trình tự axit amin được thay đổi. Thuật ngữ "biến thể alen" còn được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ protein được mã hóa bởi biến thể alen của gen. Thông thường, dạng tham chiếu của gen mã hóa dạng kiểu dại và/hoặc dạng phổ biến của polypeptit từ quần thể hoặc một thành viên tham chiếu của loài. Thông thường, biến thể alen, bao gồm các biến thể giữa và trong loài thường có độ tương đồng axit amin ít nhất 80%, 90% hoặc cao hơn với dạng kiểu dại và/hoặc dạng chiếm ưu thế từ cùng loài đó; mức độ tương đồng phụ thuộc vào gen và vào việc liệu sự so sánh là giữa các loài hay trong cùng loài. Thông thường, các biến thể alen trong cùng loài có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, 85%, 90% hoặc 95% hoặc cao hơn với dạng kiểu dại và/hoặc dạng chiếm ưu thế, bao gồm độ tương đồng là 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn với dạng kiểu dại và/hoặc dạng chiếm ưu thế của polypeptit. Việc đề cập đến biến thể alen trong bản mô tả này thường chỉ sự biến đổi các protein trong số các thành viên của cùng loài.

Trong bản mô tả này, "alen" được sử dụng thay thế với "biến thể alen" trong bản mô tả này chỉ dạng thay thế của gen hoặc các phần của chúng. Các alen chiếm đóng cùng locut hoặc vị trí trên các nhiễm sắc thể tương đồng. Khi đối tượng có hai alen giống nhau của một gen, đối tượng này được gọi là đồng hợp tử đối với gen hoặc alen đó. Khi đối tượng có hai alen khác nhau của một gen, đối tượng này được gọi là dị hợp tử đối với gen. Các alen của một gen cụ thể có thể khác nhau ở một nucleotit hoặc một vài nucleotit, và có thể bao gồmsự thế, sự loại bỏ và sự chèn nucleotit. Alen của gen còn có thể là dạng gen chứa đột biến.

Trong bản mô tả này, biến thể loài để chỉ biến thể trong polypeptit giữa các loài khác nhau, bao gồm các loài động vật có vú khác nhau, như chuột nhắt và người. Ví dụ về các biến thể loài được đề xuất trong bản mô tả này là PH20 của linh trưởng, như, nhưng không bị giới hạn ở, người, tinh tinh, khỉ đuôi ngắn và khỉ cynomologus. Nhìn chung, các biến thể loài có độ tương đồng trình tự 70%, 75%. 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc đồng nhất. Các gốc tương ứng giữa và trong

số các biến thể loài có thể được xác định bằng cách so sánh và căn trình tự để làm tối đa hóa số lượng nucleotit hoặc gốc khớp, ví dụ, sao cho độ tương đồng giữa các trình tự là bằng hoặc lớn hơn 95%, bằng hoặc lớn hơn 96%, bằng hoặc lớn hơn 97%, bằng hoặc lớn hơn 98% hoặc bằng lớn hơn 99%. Sau đó, vị trí được quan tâm được đưa ra số được chỉ định trong phân tử axit nucleic tham chiếu. Sự căn trình tự có thể được thực hiện thủ công hoặc bằng mắt, đặc biệt là, khi mức tương đồng trình tự lớn hơn 80%. Ví dụ, sự căn trình tự trên Fig.1 cho thấy rằng gốc axit amin 491 của PH20 người tương ứng với gốc axit amin 491 của PH20 tinh tinh và gốc axit amin 497 của PH20 người tương ứng với gốc axit amin 498 của PH20 tinh tinh.

Trong bản mô tả này, biến thể ghép để chỉ biến thể được tạo ra bằng cách xử lý chuyên hoá bản phiên mã sơ cấp của ADN hệ gen để tạo ra nhiều hơn một loại mARN.

Trong bản mô tả này, sự cải biến là để chỉ sự cải biến trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự nucleotit trong phân tử axit nucleic và lần lượt bao gồm sự loại bỏ, sự chèn, và sự thế axit amin và nucleotit. Các phương pháp cải biến polypeptit là thông dụng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như bằng cách sử dụng các phương pháp ADN tái tổ hợp.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ trình tự khởi động có nghĩa là phần của gen chứa trình tự ADN mà tạo ra sự liên kết của ARN polymeraza và sự khởi động phiên mã. Trình tự khởi động thường, nhưng không phải luôn luôn, được tìm thấy ở vùng không mã hóa đầu 5' của gen.

Trong bản mô tả này, polypeptit hoặc protein được phân lập hoặc được tinh chế hoặc phần có hoạt tính sinh học của chúng là về cơ bản không chứa vật liệu tế bào hoặc các protein tạp chất khác từ tế bào hoặc mô mà protein này thu được, hoặc về cơ bản không chứa các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác khi được tổng hợp bằng phương pháp hóa học. Chế phẩm có thể được xác định là về cơ bản không chứa nếu chúng không chứa các tạp chất có thể phát hiện được dễ dàng như được xác định bằng các phương pháp phân tích chuẩn, như phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC), phương pháp điện di gel và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để đánh giá độ tinh khiết này, hoặc tinh khiết đáng kể sao cho bước tinh chế tiếp theo không làm thay đổi theo cách có thể phát hiện được các tính chất vật lý và hóa học, như hoạt tính enzym và hoạt tính sinh học, của chất. Các

phương pháp tinh chế hợp chất để tạo ra hợp chất về cơ bản tinh khiết hóa học là đã biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Tuy nhiên, hợp chất về cơ bản tinh khiết hóa học có thể là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể. Trong các trường hợp này, bước tinh chế tiếp theo có thể làm tăng hoạt tính đặc hiệu của hợp chất.

Vì vậy, viện dẫn đến polypeptit gần như tinh khiết, như PH20 kéo dài tan được gần như tinh khiết dùng để chỉ chế phẩm của protein PH20 mà về cơ bản không chứa vật liệu tế bào bao gồm các chế phẩm của protein trong đó protein được tách khỏi các thành phần tế bào của tế bào mà từ đó nó được phân lập hoặc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Theo một phương án, thuật ngữ về cơ bản không chứa vật liệu tế bào bao gồm chế phẩm của protein enzym có lượng protein không phải là enzym là ít hơn khoảng 30% (theo khối lượng khô) (cũng được gọi trong bản mô tả này là protein tạp chất), thường có lượng protein không phải là enzym là ít hơn khoảng 20% hoặc có lượng protein không phải là enzym là 10% hoặc có lượng protein không phải là enzym là ít hơn khoảng 5%. Khi protein enzym được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, thì về cơ bản, nó cũng không chứa môi trường nuôi cấy, tức là, môi trường nuôi cấy có mặt là ít hơn khoảng hoặc bằng 20%, 10% hoặc 5% thể tích của chế phẩm protein enzym.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ về cơ bản không chứa tiền chất hoá học hoặc các hóa chất khác bao gồm chế phẩm của protein enzym trong đó protein được tách khỏi các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác mà tham gia vào sự tổng hợp protein. Thuật ngữ này bao gồm chế phẩm của protein enzym có lượng tiền chất hóa học hoặc chất hóa học hoặc thành phần không phải là enzym là ít hơn khoảng 30% (theo khối lượng khô), 20%, 10%, 5% hoặc ít hơn.

Trong bản mô tả này, tổng hợp, khi đề cập đến, ví dụ, phân tử axit nucleic tổng hợp hoặc gen tổng hợp hoặc peptit tổng hợp, để chỉ phân tử axit nucleic hoặc phân tử polypeptit được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp và/hoặc bằng các phương pháp tổng hợp hóa học.

Trong bản mô tả này, việc tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp dùng để chỉ việc sử dụng các phương pháp sinh học phân tử đã biết rõ để biểu hiện protein được mã hóa bởi ADN được tách dòng.

Trong bản mô tả này, vectơ (hoặc plasmit) để chỉ yếu tố riêng biệt được sử dụng để đưa axit nucleic khác loại vào tế bào để biểu hiện hoặc sao chép chúng. Vectơ này thường vẫn vẫn giữ thể bổ sung, nhưng có thể được thiết kế để thực hiện việc hợp nhất gen hoặc phần của nó vào nhiễm sắc thể của hệ gen. Sáng chế cũng đề xuất vectơ mà là nhiễm sắc thể nhân tạo như nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men và nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú. Việc chọn lọc và sử dụng các vật truyền này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong bản mô tả này, vectơ biểu hiện bao gồm vectơ có khả năng biểu hiện ADN mà được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa, như vùng trình tự khởi động, có khả năng tác động đến sự biểu hiện của các mảnh ADN này. Các đoạn bổ sung này có thể bao gồm trình tự khởi động và trình tự kết thúc, và tùy ý, có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc tái bản, một hoặc nhiều chỉ thị chọn lọc, yếu tố tăng cường, tín hiệu polyadenyl hoá, và yếu tố tương tự. Vectơ biểu hiện thường có nguồn gốc từ plasmit hoặc ADN của virut, hoặc có thể chứa các yếu tố của cả hai. Do đó, vectơ biểu hiện để chỉ cấu trúc ADN hoặc ARN tái tổ hợp, như plasmit, thể thực khuẩn, virut tái tổ hợp hoặc các vectơ khác mà, khi đưa vào tế bào chủ thích hợp, vectơ này tạo ra sự biểu hiện của ADN được tách dòng. Vectơ biểu hiện thích hợp là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm vectơ biểu hiện có thể sao chép được trong tế bào nhân chuẩn và/hoặc tế bào nhân sơ và vectơ mà vẫn giữ thể bổ sung hoặc vectơ mà hợp nhất vào trong hệ gen của tế bào chủ.

Trong bản mô tả này, vectơ cũng bao gồm "vectơ virut" hoặc "vectơ của virut". Vectơ virut là virut được thiết kế mà được liên kết hoạt động với gen ngoại sinh để chuyển (làm vật truyền hoặc thể mang) gen ngoại sinh vào tế bào.

Trong bản mô tả này, theo các hoạt động hoặc được liên kết hoạt động khi đề cập đến đoạn ADN có nghĩa là đoạn này được sắp xếp sao cho chúng thực hiện chức năng phù hợp với mục đích dự định của chúng, ví dụ, quá trình phiên mã bắt đầu ở xuôi dòng của trình tự khởi động và ngược dòng của các trình tự được phiên mã bất kỳ. Trình tự khởi động này luôn là miền mà cơ chế phiên mã liên kết với sự khởi đầu phiên mã và tiếp diễn qua đoạn mã hóa đến trình tự kết thúc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "đánh giá" nhằm bao gồm việc xác định định lượng và định tính theo hướng thu được giá trị tuyệt đối cho hoạt tính của proteaza, hoặc

miền của chúng, có mặt trong mẫu, và cũng theo hướng thu được chỉ số, tỷ lệ, tỷ lệ phần trăm, giá trị thấy được hoặc giá trị khác biểu thị mức độ của hoạt tính. Việc đánh giá có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp và bản thân loại chất hoá học thực sự được phát hiện không cần thiết phải là sản phẩm phân giải protein mà có thể, ví dụ, là dẫn xuất của chúng hoặc chất nào đó khác. Ví dụ, việc phát hiện sản phẩm phân cắt của protein bổ sung, như bằng SDS-PAGE và protein nhuộm bằng xanh Coomasie.

Trong bản mô tả này, hoạt tính sinh học chỉ hoạt tính *in vivo* của hợp chất hoặc đáp ứng sinh lý tạo ra khi sử dụng hợp chất, chế phẩm hoặc hỗn hợp khác *in vivo*. Do đó, hoạt tính sinh học bao gồm tác dụng trị liệu và dược tính của hợp chất, chế phẩm và hỗn hợp này. Hoạt tính sinh học có thể được quan sát thấy ở các hệ *in vitro* được thiết kế để thử nghiệm hoặc sử dụng các hoạt tính này. Do đó, đối với mục đích của sáng chế, hoạt tính sinh học của proteaza là hoạt tính xúc tác của nó trong đó polypeptit được thuỷ phân.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ tương đương, khi đề cập đến hai trình tự axit nucleic, có nghĩa là hai trình tự đang nói đến này mã hóa cùng một trình tự axit amin hoặc protein tương đương. Khi thuật ngữ tương đương được sử dụng liên quan đến hai protein hoặc peptit, thuật ngữ này có nghĩa là hai protein hoặc peptit này có trình tự axit amin về cơ bản giống nhau, chỉ có các sự thế axit amin mà về cơ bản không làm thay đổi hoạt tính hoặc chức năng của protein hoặc peptit. Khi thuật ngữ tương đương chỉ tính chất, tính chất này không cần thiết phải thể hiện ở cùng một mức độ (ví dụ như hai peptit có thể thể hiện tỷ lệ khác nhau của cùng một loại hoạt tính enzym), nhưng các hoạt tính thường về cơ bản giống nhau.

Trong bản mô tả này, "điều biến" và "sự điều biến" hoặc "thay đổi" để chỉ sự thay đổi hoạt tính của phân tử, như protein. Các hoạt tính làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các hoạt tính sinh học, như sự truyền tín hiệu. Sự điều biến có thể bao gồm sự tăng hoạt tính (tức là điều hòa tăng hoặc hoạt tính chủ vận), sự giảm hoạt tính (tức là điều hòa giảm hoặc ức chế) hoặc các thay đổi hoạt tính bất kỳ khác (như thay đổi chu kỳ, tần suất, khoảng thời gian, động lực học hoặc các thông số khác). Sự điều biến có thể phụ thuộc vào ngữ cảnh và thông thường, sự điều biến được so sánh với trạng thái được chỉ định, ví dụ, protein kiểu dại, protein ở trạng thái cơ định, hoặc protein được biểu hiện ở loại tế bào hoặc điều kiện được chỉ định.

Trong bản mô tả này, chế phẩm để chỉ hỗn hợp bất kỳ. Chế phẩm có thể là dung dịch, huyền phù, chất lỏng, bột, bột nhão, dạng chứa nước, dạng không chứa nước hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Trong bản mô tả này, sự kết hợp để chỉ sự liên kết bất kỳ giữa hoặc trong số hai hoặc nhiều thực thể. Sự kết hợp có thể là hai hoặc nhiều thực thể riêng biệt, như hai chế phẩm hoặc hai tập hợp, có thể là hỗn hợp của chúng, như hỗn hợp đơn gồm hai hoặc nhiều thực thể, hoặc sự biến thiên bất kỳ của chúng. Các yếu tố của sự kết hợp thường được liên kết hoặc có liên quan về mặt chức năng.

Trong bản mô tả này, "bệnh hoặc rối loạn" để chỉ tình trạng bệnh lý ở sinh vật do nguyên nhân hoặc tình trạng bệnh bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự nhiễm khuẩn, tình trạng bệnh mắc phải, tình trạng bệnh di truyền, và được đặc trưng bởi các triệu chứng có thể nhận biết. Các bệnh và rối loạn được quan tâm ở đây là các bệnh và rối loạn có liên quan đến các thành phần của ECM.

Trong bản mô tả này, "điều trị" đối tượng mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh có nghĩa là các triệu chứng của đối tượng được làm giảm nhẹ một phần hoặc hoàn toàn, hoặc vẫn không thay đổi sau khi điều trị. Do đó việc điều trị bao gồm việc phòng bệnh, trị liệu và/hoặc cứu chữa. Việc phòng bệnh chỉ việc ngăn ngừa bệnh có thể xảy ra và/hoặc ngăn ngừa việc xấu đi của các triệu chứng hoặc tiến triển của bệnh. Việc điều trị cũng bao gồm việc sử dụng bất kỳ về mặt dược lý interferon được cả biến và các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, chất có tác dụng dược lý, bao gồm chất trị liệu hoặc chất hoạt tính sinh học bất kỳ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ví dụ, chất gây mê, chất co mạch, chất phân tán, thuốc trị liệu thông thường, bao gồm thuốc dạng phân tử nhỏ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bisphosphonat, và protein trị liệu, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, insulin, phân tử IgG, và kháng thể.

Trong bản mô tả này, điều trị có nghĩa là cách bất kỳ trong đó các triệu chứng của tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh hoặc các dấu hiệu khác, được làm thuyên giảm hoặc theo cách khác, được thay đổi theo hướng có lợi.

Trong bản mô tả này, hiệu quả trị liệu có nghĩa là hiệu quả là kết quả từ việc điều trị cho đối tượng mà làm thay đổi, thường là cải thiện hoặc làm thuyên giảm các triệu

chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh hoặc chữa trị bệnh hoặc tình trạng bệnh. Lượng có hiệu quả điều trị để chỉ lượng chế phẩm, phân tử hoặc hợp chất mà tạo ra hiệu quả trị liệu sau khi dùng cho đối tượng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" để chỉ động vật, bao gồm động vật có vú, như người.

Trong bản mô tả này, bệnh nhân dùng để chỉ đối tượng là người biểu lộ các triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

Trong bản mô tả này, sự cải thiện các triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn cụ thể bằng cách điều trị, như bằng cách dùng dược phẩm hoặc chất trị liệu khác, chỉ việc làm giảm bớt bất kỳ, dù là vĩnh viễn hoặc tạm thời, kéo dài hoặc tạm thời, các triệu chứng có thể quy cho là do hoặc liên quan tới việc dùng chế phẩm hoặc chất trị liệu.

Trong bản mô tả này, ngăn ngừa hoặc phòng bệnh để chỉ phương pháp trong đó nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh được giảm.

Trong bản mô tả này, "lượng có hiệu quả điều trị" hoặc "liều có hiệu quả điều trị" để chỉ lượng chất, hợp chất, vật liệu, hoặc chế phẩm chứa hợp chất mà ít nhất đủ để tạo ra hiệu quả trị liệu. Do đó, lượng này là lượng cần thiết để ngăn ngừa, chữa trị, cải thiện, làm ngừng hoặc làm ngừng một phần triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

Trong bản mô tả này, dạng liều đơn vị để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp cho các đối tượng là người và động vật và được đóng gói riêng rẽ như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong bản mô tả này, chế phẩm liều đơn vị để chỉ chế phẩm để dùng trực tiếp.

Trong bản mô tả này, "sản phẩm của quá trình sản xuất" là sản phẩm được tạo ra và được bán. Như được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả này, thuật ngữ này được dự định bao gồm chất trị liệu với PH20 tan được, như esPH20, hoặc esPH20 một mình, được chứa trong cùng sản phẩm đóng gói hoặc trong các sản phẩm đóng gói riêng rẽ.

Trong bản mô tả này, dịch để chỉ chế phẩm bất kỳ mà có thể chảy. Do đó, dịch bao gồm chế phẩm ở dạng bán rắn, bột nhão, dung dịch, hỗn hợp chứa nước, gel, kem lỏng, kem và các chế phẩm tương tự khác.

Trong bản mô tả này, "kit" để chỉ sự kết hợp của các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này và thực thể khác nhằm mục đích bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hoàn nguyên, hoạt hoá, và dụng cụ/thiết bị để phân phối, dùng, chẩn đoán, và đánh giá hoạt tính hoặc tính chất sinh học. Kit tùy ý bao gồm hướng dẫn sử dụng.

Trong bản mô tả này, dịch chiết tế bào hoặc chất dung giải tế bào để chỉ chế phẩm hoặc phân đoạn được tạo ra từ tế bào bị dung giải hoặc bị phá vỡ.

Trong bản mô tả này, động vật bao gồm động vật bất kỳ, như, nhưng không bị giới hạn ở linh trưởng bao gồm người, khỉ gorila và khỉ; loài gặm nhấm như chuột nhắt và chuột cống; gia cầm như gà; động vật nhai lại như dê, bò, hươu, cừu; lợn và các động vật khác. Động vật không phải là người không bao gồm người là động vật được dự tính. Enzym được đề xuất trong bản mô tả này là từ nguồn bất kỳ, động vật, thực vật, sinh vật nhân sơ và nấm. Hầu hết enzym đều có nguồn gốc từ động vật, bao gồm nguồn gốc từ động vật có vú.

Trong bản mô tả này, đối chứng để chỉ mẫu mà gần giống với mẫu thử nghiệm, ngoại trừ việc nó không được xử lý với thông số thử nghiệm, hoặc, nếu nó là mẫu huyết tương, nó có thể là từ tình nguyện viên bình thường không mắc tình trạng bệnh đang nói đến. Đối chứng cũng có thể là đối chứng nội bộ.

Trong bản mô tả này, dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh thể hiện rõ ràng là khác. Do đó, ví dụ, việc đề cập đến hợp chất chứa "miền ngoại bào" bao gồm các hợp chất có một hoặc nhiều miền ngoại bào.

Trong bản mô tả này, phạm vi và lượng có thể được thể hiện dưới dạng "khoảng" giá trị hoặc phạm vi cụ thể. Khoảng cũng bao gồm lượng chính xác. Do đó "khoảng 5 bazơ" có nghĩa là "khoảng 5 bazơ" và cũng có nghĩa là "5 bazơ."

Trong bản mô tả này, "tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được nêu sau đó có xảy ra hoặc không xảy ra, và phần mô tả bao gồm các trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình huống xảy ra và các trường hợp trong đó nó không xảy ra. Ví dụ, nhóm được thế tùy ý có nghĩa là nhóm này không được thế hoặc được thế.

Trong bản mô tả này, các chữ viết tắt cho các nhóm bảo vệ, axit amin và các hợp chất khác bất kỳ, trừ khi được thể hiện theo cách khác, tương ứng với cách sử dụng phổ

biến của chúng, là các ký hiệu viết tắt được công nhận, hoặc danh pháp hóa sinh theo Hội đồng IUPAC-IUB (xem, (1972) *Biochem. 11*:1726).

B. Tổng quan

Hyaluronidaza là enzym xúc tác sự thủy phân của axit hyaluronic, nhờ đó làm giảm độ nhớt của axit hyaluronic và làm tăng khả năng thấm của mô. PH20 là hyaluronidaza có hoạt tính trung tính và có hoạt tính axit mà thể hiện hoạt tính tối ưu khi được glycosyl hóa. PH20 của người là protein được gắn neo GPI mà được gắn neo với mảnh nhỏ ngoại bào của màng huyết tương thông qua neo glycosylphosphatidylinositol (GPI) được gắn vào đầu cùng C của protein. Việc bổ sung neo GPI vào tất cả các protein được gắn neo GPI xảy ra sau sự phân cắt ở vị trí axit amin đặc hiệu, được gọi là vị trí ω (thường được tìm thấy ở khoảng 20-30 axit amin từ đầu cùng C), và sự loại bỏ phần đầu cùng C trong ER. Phần đầu cùng C này là trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Trình tự tín hiệu gắn neo GPI của PH20 của người nằm ở các vị trí axit amin 491-509 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107, và vị trí ω là vị trí axit amin 490. Polypeptit PH20 được gắn neo GPI như PH20 của người được liên kết màng và, do đó, không tan. Dạng không tan của PH20 thường không thích hợp cho mục đích trị liệu.

Polypeptit PH20 thiếu neo GPI thường được tiết bởi tế bào trong quá trình biểu hiện vì chúng không chứa trình tự tín hiệu gắn GPI mà khóa polypeptit với màng. Phát hiện thấy ở đây rằng dạng tan được của PH20 còn bao gồm các dạng chứa các gốc trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Polypeptit PH20 kéo dài tan được (esPH20) là protein PH20 tan được mà được cắt cụt ở đầu cùng C nhưng vẫn giữ một hoặc nhiều gốc axit amin được định vị trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI của polypeptit PH20 kiểu dại tương ứng. Các polypeptit esPH20 như vậy là tan được và có thể được sử dụng làm polypeptit trị liệu, như để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan và/hoặc đóng vai trò làm chất phân bố hoặc chất phân tán để xúc tiến, tăng cường hoặc làm tăng sự phân tán và phân phối của các chất, thuốc và protein khác nhờ đó cải thiện đặc tính dược động học và dược lực học của chất, thuốc hoặc protein được đồng sử dụng.

1. PH20

PH20, còn được biết đến là protein bề mặt tinh trùng, phân tử bám dính tinh trùng 1, SPAM1 hoặc HYAL3, là hyaluronidaza. Hyaluronidaza là họ enzym mà phân hủy axit

hyaluronic (còn được biết là hyaluronan hoặc hyaluronat hoặc HA), thành phần thiết yếu của cơ chất ngoại bào và thành phần chính của hàng rào kẽ. Bằng cách xúc tác sự thủy phân của axit hyaluronic, hyaluronidaza làm giảm độ nhớt của axit hyaluronic, nhờ đó làm tăng khả năng thấm của mô. Như vậy, hyaluronidaza được sử dụng, ví dụ, làm chất phân bố hoặc chất phân tán kết hợp với các chất, thuốc và protein khác để tăng cường sự phân tán và phân phối của chúng, và cải thiện đặc tính dược động học và dược lực học của chất, thuốc hoặc protein được đồng sử dụng.

PH20, giống như các hyaluronidaza ở động vật có vú khác, là endo-β-N-axetyl-hexosaminidaza thủy phân liên kết β1→4 glycosit của axit hyaluronic thành các oligosacarit có chiều dài khác nhau như tetrasacarit và hexasacarit. PH20 có cả hoạt tính thủy phân và hoạt tính transglycosidaza và có thể phân hủy axit hyaluronic và chondroitin sulfat, như C4-S và C6-S. PH20 có liên quan về mặt tự nhiên với sự bám dính trứng-tinh trùng và trợ giúp sự thấm bởi tinh trùng của lớp tế bào mấu mang trứng bằng cách cắt axit hyaluronic. PH20 nằm trên bề mặt tinh trùng, và trong đầu tinh trùng có nguồn gốc từ lysosom, ở đó nó được liên kết với màng đầu tinh trùng bên trong. PH20 màng huyết tương có hoạt tính hyaluronidaza chỉ ở độ pH trung tính, trong khi PH20 màng đầu tinh trùng bên trong có hoạt tính ở cả pH trung tính và axit. Ngoài việc là hyaluronidaza, PH20 còn biểu lộ là thụ thể cho sự truyền tín hiệu tế bào được cảm ứng bởi HA, và thụ thể cho vùng trong suốt bao quanh noãn bào.

Protein PH20 làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polypeptit PH20 của người (polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107, polypeptit trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:108), bò (các SEQ ID NO:111 và 119), thỏ (SEQ ID NO:112), cừu (các SEQ ID NO:113, 118 và 120), khỉ cynomolgus (SEQ ID NO:114), chuột lang (SEQ ID NO:115), chuột cống (SEQ ID NO:116), chuột nhắt (SEQ ID NO:117), tinh tinh (SEQ ID NO:197) và khỉ Rhesus (SEQ ID NO:198). Sản phẩm phiên mã mARN PH20 của người thường được dịch mã để tạo ra protein tiền chất bao gồm 509 axit amin (SEQ ID NO:107) chứa trình tự tín hiệu 35 axit amin ở đầu cùng N (vị trí gốc axit amin 1-35 của SEQ ID NO:107). Như vậy, sau sự vận chuyển vào ER và loại bỏ peptit tín hiệu, polypeptit trưởng thành bao gồm 474 axit amin với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:108 được tạo ra. Như được bàn luận dưới đây, peptit đầu cùng C sau đó bị phân cắt trong ER để thúc đẩy sự gắn kết cộng hóa trị của neo GPI vào axit amin đầu

cùng C mới được tạo thành ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí 490 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107.

PH20 của người là hyaluronidaza nguyên gốc có hoạt tính trung tính mà thường bị khóa với màng huyết tương thông qua neo glycosylphosphatidylinositol (GPI). Như được lưu ý ở trên, PH20 cũng được biểu hiện trên màng đầu tinh trùng bên trong mà ở đó nó có hoạt tính hyaluronidaza ở cả pH trung tính và axit. Bằng chứng gợi ý rằng vùng Peptit 1 của PH20, mà tương ứng với axit amin 142-172 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107, là cần cho hoạt tính enzym ở độ pH trung tính. Vùng Peptit 3, mà tương ứng với axit amin 277-297 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107, thể hiện là quan trọng đối với hoạt tính enzym ở độ pH axit (Cherr et al., (2001) *Matrix Biology* 20:515-525). Như vậy, thể hiện là PH20 chứa hai vị trí xúc tác. Ngoài vị trí xúc tác, PH20 cũng chứa vị trí liên kết hyaluronan. Bằng chứng thử nghiệm gợi ý rằng vị trí này được định vị trong vùng Peptit 2, mà tương ứng với các vị trí axit amin 205-235 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107. Vùng này được bảo toàn cao trong số các hyaluronidaza và tương tự với môtip liên kết heparin.

a. Sự glycosyl hóa

Sự glycosyl hóa, bao gồm sự glycosyl hóa được liên kết với N và O, của một số enzym phân hủy hyaluronan, bao gồm hyaluronidaza, có thể là quan trọng đối với hoạt tính xúc tác và độ ổn định của chúng. Oligosacarit được liên kết với N được chia thành một số loại chính (oligomanoza, phức hợp, lai), tất cả trong số này đều có lõi $(Man)_3$-GlcNAc-GlcNAc được gắn qua nitơ amit của các gốc Asn mà nằm trong trình tự -Asn-Xaa-Thr/Ser- (trong đó Xaa không phải là Pro). Vị trí glycosyl hóa bổ sung ở -Asn-Xaa-Cys- được báo cáo cho protein đông máu C. Trong một số ví dụ, enzym phân hủy hyaluronan, như hyaluronidaza, có thể chứa cả liên kết với N-glycosit và O-glycosit. Ví dụ, PH20 có một oligosacarit được liên kết với O ở axit amin T475 cũng như sáu oligosacarit được liên kết với N ở axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của PH20 của người, được nêu làm ví dụ trong SEQ ID NO: 107. Các gốc axit amin N82, N166 và N254 bị chiếm chỗ bởi glycan loại phức hợp trong khi các gốc axit amin N368 và N393 bị chiếm chỗ bởi glycan loại manoza cao (xem, chẳng hạn Ví dụ 6 dưới đây). Gốc axit amin N235 bị chiếm chỗ bởi khoảng 80% glycan loại manoza cao và 20% glycan loại phức hợp.

Mặc dù việc thay đổi loại glycan làm cải biến glycoprotein có thể có ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh kháng nguyên của protein, sự gấp nếp cấu trúc, khả năng hòa tan, và độ ổn định, nhưng hầu hết enzym không được xem là cần sự glycosyl hóa cho hoạt tính enzym tối ưu. Đối với một số hyaluronidaza, việc loại bỏ sự glycosyl hóa được liên kết với N có thể tạo ra sự bất hoạt gần như hoàn toàn hoạt tính hyaluronidaza. Như vậy, đối với các hyaluronidaza này, sự có mặt của glycan được liên kết với N là cần thiết để tạo ra enzym có hoạt tính. Sự có mặt của glycan được liên kết với N trong polypeptit PH20 là cần thiết để tạo ra enzym có hoạt tính. Ví dụ, phát hiện thấy ở đây, rằng sự khử glycosyl hóa hoàn toàn của PH20 người, bằng cách xử lý bằng endoglycosidaza PNGaseF hoặc chất ức chế GlcNAc phosphotransferaza (GPT) tunicamyxin, tạo ra sự mất hoàn toàn hoạt tính hyaluronidaza (xem, ví dụ, Ví dụ 7-8, dưới đây). Trái lại, sự khử glycosyl hóa một phần của PH20 người, bằng cách xử lý bằng endoglycosidaza EndoF1, EndoF2, EndoF3 hoặc EndoH, không ảnh hưởng đến hoạt tính hyaluronidaza của PH20 người (xem, ví dụ, Ví dụ 7, dưới đây).

b. Sự gắn neo GPI

PH20 người là protein được gắn neo GPI. Như vậy, polypeptit PH20 được neo với mảnh nhỏ ngoại bào của màng huyết tương thông qua neo glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) được gắn vào đầu cùng C của protein. Protein được gắn neo GPI như PH20 người được dịch mã với peptit tín hiệu đầu cùng N có thể phân cắt được mà định hướng protein này đến thể lưới nội chất (ER). Ở đầu cùng C của các protein này là trình tự tín hiệu khác mà điều khiển sự bổ sung neo GPI được tạo thành trước vào polypeptit trong lòng ống của ER. Neo GPI bổ sung xuất hiện sau sự phân cắt của phần đầu cùng C ở vị trí axit amin đặc hiệu, được gọi là vị trí ω (thường nằm ở khoảng 20-30 axit amin từ đầu cùng C). Mặc dù dường như không có trình tự liên ứng để nhận dạng sự định vị của vị trí ω, protein được gắn neo GPI chứa trình tự tín hiệu gắn neo GPI đầu cùng C hoặc miền mà thường chứa vùng chủ yếu kỵ nước gồm 8-20 axit amin, được đứng trước bởi vùng đệm ưa nước gồm 8-12 axit amin ngay sau vị trí ω. Vùng đệm ưa nước này thường giàu axit amin tích điện và prolin (White et al., (2000) *J. Cell Sci.* 113(Pt.4):721-727). Phân tích chi tiết hơn gợi ý rằng có vùng gồm khoảng 11 axit amin trước vị trí ω-1 mà được đặc trưng bởi lượng ít cấu trúc bậc hai được dự đoán, vùng xung quanh vị trí cắt (vị trí ω), từ ω-1 đến ω+2 mà được đặc trưng bởi sự có mặt của các gốc mạch bên nhỏ, vùng đệm giữa

các vị trí ω+3 và ω+9, và đuôi kỵ nước từ ω+10 đến đầu cùng C (Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392).

Mặc dù không có trình tự liên ứng tín hiệu gắn neo GPI, các phương pháp và thuật toán *in silico* khác nhau được phát triển mà có thể được sử dụng để nhận dạng các trình tự này trong các polypeptit (xem, ví dụ Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758; Kronegg and Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (Neo GPI) in protein (DGPI)," 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852;Omaetxebarria et al., (2007)*Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), bao gồm các phương pháp và kỹ thuật sẵn có trên trang web tin sinh, như trang công cụ ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). Như vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định xem liệu polypeptit PH20 có khả năng chứa trình tự tín hiệu gắn neo GPI hay không, và, do đó, xác định xem polypeptit PH20 này là protein được gắn neo GPI hay không.

Trình tự tín hiệu gắn neo GPI của PH20 người nằm ở các vị trí axit amin 491-509 của polypeptit tiền chất được nêu trong SEQ ID NO:107, và vị trí ω là axit amin vị trí 490. Như vậy, trong mô hình thử nghiệm này của PH20 người, axit amin 491-509 bị phân cắt sau sự vận chuyển đến ER và neo GPI được gắn theo cách cộng hóa trị vào gốc serin ở vị trí 490. Do vậy, sự gắn kết cộng hóa trị của neo GPI với đầu cùng C của PH20 của người và bản chất được liên kết màng của PH20, được xác nhận bằng cách sử dụng các nghiên cứu sự thủy phân phospholipaza đặc hiệu phosphatidylinositol C (PI-PLC) (xem, ví dụ, Lin et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 125:1157-1163 và Ví dụ 3, dưới đây). Phospholipaza đặc hiệu phosphatidylinositol C (PI-PLC) và D (PI-PLD) thủy phân Neo GPI, giải phóng polypeptit PH20 khỏi màng tế bào. Do vậy, polypeptit PH20 được giải phóng thu được là tan được. PH20 tan được có thể được phát hiện và được phân biệt với PH20 không tan, được liên kết màng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các phương pháp sử dụng thử nghiệm Triton® X-114, như được nêu dưới đây và trong Ví dụ 4. Trong thử nghiệm này, hyaluronidaza PH20 tan được phân bố vào pha nước của dung dịch Triton® X-114 được làm ấm đến nhiệt độ 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7) trong khi hyaluronidaza PH20 bám màng phân bố vào pha giàu chất tẩy rửa. Như vậy, ngoài

việc sử dụng thuật toán để đánh giá xem polypeptit PH20 có được gắn neo GPI một cách tự nhiên hay không, thử nghiệm về độ hòa tan cũng có thể được tiến hành.

C. Polypeptit PH20 kéo dài tan được

Sáng chế đề xuất polypeptit và chế phẩm PH20 kéo dài tan được (esPH20). Ví dụ về polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit esPH20 của linh trưởng, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polypeptit esPH20 người và tinh tinh. Polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này là tan được, tức là được tiết, protein PH20mà được cắt cụt ở đầu cùng C nhưng vẫn giữ ít nhất một hoặc nhiều gốc axit amin được định vị trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI của polypeptit PH20 kiểu dại tương ứng (ví dụ được cắt cụt ở các vị trí axit amin 491-500). Polypeptit esPH20 có thể được tạo ra từ bất kỳ polypeptit PH20 được gắn neo GPI bằng cách cải biến polypeptit PH20 được gắn neo GPI, sự cải biến này là loại bỏ một phần của trình tự tín hiệu gắn neo GPI, với điều kiện là polypeptit PH20 thu được là tan được. Khả năng hòa tan, hoặc sự tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào, có thể được xác định bởi SDS-PAGE và phân tích thẩm tách western trong quá trình biểu hiện, hoặc theo cách khác, trong thử nghiệm Triton® X-114, như được nêu dưới đây và trong Ví dụ 4, khi polypeptit PH20 được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm sự biểu hiện tái tổ hợp và sự tổng hợp polypeptit. Polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng, ví dụ, làm polypeptit trị liệu, như chất phân bố hoặc chất phân tán kết hợp với các chất, thuốc và protein khác để tăng cường sự phân tán và phân phối của chúng, và để cải thiện đặc tính dược động học và dược lực học của chất, thuốc hoặc protein được đồng sử dụng.

Polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc nhiều gốc axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI, với điều kiện là polypeptit PH20 này là tan được, tức là, phân bố vào pha nước của dung dịch Triton® X-114, như được nêu dưới đây. Polypeptit PH20 kéo dài tan được được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách tạo nên các phần cắt cụt ở đầu cùng C đối với bất kỳ polypeptit PH20 được gắn neo GPI một cách tự nhiên, trong đó polypeptit PH20 thu được là tan được và chứa 1 hoặc nhiều gốc axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định được polypeptit PH20 được gắn neo GPI hay không bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật

này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sử dụng thuật toán đã biết để dự đoán sự có mặt và sự định vị của trình tự tín hiệu gắn neo GPI và vị trí ω, và tiến hành phân tích độ hòa tan trước và sau khi cắt bằng phospholipaza đặc hiệu phosphatidylinositol C (PI-PLC) hoặc D (PI-PLD).

Polypeptit esPH20 nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polypeptit esPH20 của linh trưởng, như, ví dụ, polypeptit esPH20 người và tinh tinh. Ví dụ, polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo nên bởi sự cắt cụt đầu cùng C của bất kỳ trong số polypeptit tiền chất hoặc trưởng thành được nêu trong các SEQ ID NO:107, 108, hoặc 197, hoặc các biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng, bao gồm các mảnh có hoạt tính của chúng, trong đó polypeptit thu được là tan được và vẫn giữ 1 hoặc nhiều gốc axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Biến thể alen và các biến thể khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm polypeptit có độ tương đồng trình tự 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc nhiều hơn với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 107, 108 và 197. Polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cắt cụt ở đầu cùng Cbằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều axit amin so với polypeptit kiểu dại, như polypeptit với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 107, 108 và 197, với điều kiện là polypeptit PH20 thu được là tan được và vẫn giữ 1 hoặc nhiều gốc axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI.

Polypeptit PH20 kéo dài tan được được đề xuất trong bản mô tả này vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza. Ngoài ra, polypeptit esPH20 có hoạt tính trung tính, tức là, chúng vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza ở độ pH trung tính. Hoạt tính hyaluronidaza có thể được làm tăng hoặc được làm giảm so với dạng được gắn neo GPI kiểu dại của PH20. Ví dụ, polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza mà bằng 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi dạng được gắn neo GPI kiểu dại.

1. Polypeptit esPH20 của người

Ví dụ về polypeptit esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit esPH20 của người. Polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này là tan được và chứa 1 hoặc nhiều gốc axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Như vậy, sáng chế

còn đề xuất dạng tan được của PH20 người mà GPI không thiếu hoàn toàn trình tự tín hiệu gắn neo GPI.

Polypeptit esPH20 tiền chất của người được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polypeptit có các phần cắt cụt ở đầu cùng C để tạo ra polypeptit chứa axit amin 1 đến axit amin 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Khi được biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, trình tự tín hiệu đầu cùng N bao gồm 35 axit amin bị phân cắt trong quá trình xử lý, và dạng trưởng thành của protein được tiết. Như vậy, polypeptit esPH20 trưởng thành của người chứa các axit amin từ 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của SEQ ID NO:107. Do đó, polypeptit esPH20 trưởng thành của người được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 59-63 và 100-104, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng.

Polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể được biểu hiện trong tế bào CHO, hoặc theo cách khác được sản xuất ở tế bào bất kỳ hoặc bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, với điều kiện là chúng tan được và chứa ít nhất một axit amin từ trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Polypeptit esPH20 tan được của người được sản xuất ở tế bào CHO là các polypeptit mà được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cần phải hiểu rằng esPH20 ở người có thể được tiết một phần, tức là, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn của polypeptit được biểu hiện được tiết vào môi trường nuôi cấy, với điều kiện là esPH20 được tiết là tan được, tức là, phân bố vào pha nước của dung dịch Triton® X-114, như được nêu dưới đây. Polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này chứa các axit amin 1-500, hoặc 36-500, được tiết một phần. Ngoài ra, khi được biểu hiện trong tế bào CHO, polypeptit esPH20 tiền chất của người chứa axit amin từ 1 đến 498, 499 hoặc 500, hoặc polypeptit esPH20 trưởng thành của người chứa các axit amin từ 36 đến 498, 499 hoặc 500, được biểu hiện yếu (xem, ví dụ, Ví dụ 3 dưới đây).

Như vậy, polypeptit esPH20 tiền chất của người nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polypeptit bất kỳ có các phần cắt cụt ở đầu cùng C để tạo ra polypeptit

chứa axit amin 1 đến axit amin 491, 492, 493, 494, 495, 496 hoặc 497 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Khi được biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, sau sự phân cắt của peptit tín hiệu đầu cùng N trong quá trình xử lý, polypeptit esPH20 trưởng thành của người chứa axit amin 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496 hoặc 497 của SEQ ID NO:107. Do đó, polypeptit esPH20 trưởng thành của người nêu làm ví dụ được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm polypeptit mà có chiều dài 456, 457, 458, 459, 460, 461 hoặc 462 axit amin, như được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 60-63 và 102-104, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng. Biến thể alen và các biến thể khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm polypeptit có độ tương đồng trình tự 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc nhiều hơn với bất kỳ trong số SEQ ID NO: 107 hoặc 108.

Sáng chế còn đề xuất polypeptit esPH20 của người được thế axit amin. Polypeptit esPH20 được thế axit amin là polypeptit esPH20 của người mà được cải biến sao cho chúng chứa các sự thế axit amin, so với polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, như được nêu trong các SEQ ID NO: 60-63 và 102-104. Như vậy, polypeptit esPH20 của người được thế axit amin là polypeptit có các phần cắt cụt ở đầu cùng C. Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 của người được thế axit amin được đề xuất trong bản mô tả này có đông tương đồng trình tự ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự axit amin được nêu dưới dạng axit amin 1 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496 hoặc 497, hoặc axit amin 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496 hoặc 497, của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Trong các ví dụ khác, polypeptit esPH20 của người được thế axit amin có độ tương đồng trình tự 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 60-63 và 102-104.

Polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza được làm tăng hoặc được làm giảm so với dạng được gắn neo GPI kiểu dại của PH20. Ví dụ, polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza mà bằng 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi dạng kiểu

dại được gắn neo GPI. Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 của người thể hiện hoạt tính hyaluronidaza được làm tăng so với dạng kiểu dại được gắn neo GPI. Hoạt tính hyaluronidaza của polypeptit esPH20 của người có thể được làm tăng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza của dạng kiểu dại được gắn neo GPI.

Polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này có hoạt tính hyaluronidaza hoạt tính trung tính, hoặc hoạt tính hyaluronidaza khi được xác định ở độ pH trung tính, mà tăng hoặc giảm so với dạng được gắn neo GPI kiểu dại của PH20. Ví dụ, polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza mà là 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc lớn hơn của hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi dạng kiểu dại được gắn neo GPI. Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 của người thể hiện hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính giảm so với dạng kiểu dại được gắn neo GPI. Hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính có thể được làm giảm 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính của dạng kiểu dại được gắn neo GPI. Trong các ví dụ khác, polypeptit esPH20 của người thể hiện hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính tăng so với dạng kiểu dại được gắn neo GPI. The hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính có thể được làm tăng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza có hoạt tính trung tính của dạng kiểu dại được gắn neo GPI.

Thông thường, polypeptit esPH20 của người được tạo ra bằng cách sử dụng hệ biểu hiện protein mà thúc đẩy sự N-glycosyl hóa chính xác để đảm bảo cho polypepit vẫn giữ được hoạt tính, vì sự glycosyl hóa đóng vai trò quan trọng cho hoạt tính xúc tác và độ ổn định của các polypeptit này. Tế bào nêu làm ví dụ hữu dụng cho sự biểu hiện tái tổ hợp của polypeptit esPH20 bao gồm, ví dụ tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) (*ví dụ* tế bào DG44 CHO hoặc tế bào CHO-S).

2. Các loại polypeptit esPH20 khác

Sáng chế đề xuất polypeptit PH20 kéo dài tan được không phải của người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể căn trình tự axit amin của PH20 người với polypeptit PH20 bất kỳ không phải của người để xác định vị trí tương ứng với vị trí 491-500 của polypeptit PH20 người được nêu trong SEQ ID NO:107, và ở vị trí đó sự cắt cụt đầu cùng C có thể được thực hiện để sản xuất polypeptit PH20 kéo dài tan được. Ngoài ra, thuật toán, như các thuật toán được mô tả ở phần khác trong bản mô tả này, có thể được sử dụng để dự đoán vị trí của trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Khả năng hòa tan của polypeptit được cắt cụt đầu cùng C có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm thử nghiệm Triton® X-114 được mô tả dưới đây và trong Ví dụ 4, để xác định xem polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng Cđược tạo ra có tan được hay không và, do vậy, có phải là polypeptit esPH20 hay không.

Sáng chế đề xuất polypeptit PH20 kéo dài tan được của loài linh trưởng không phải là người. Polypeptit PH20 được gắn neo GPI của linh trưởng không phải là người nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, PH20 của tinh tinh (SEQ ID NO:197). Do đó, sáng chế đề xuất polypeptit esPH20 của tinh tinh. Polypeptit esPH20 của tinh tinh được đề xuất trong bản mô tả này chứa sự cắt cụt đầu cùng C mà tương ứng với sự cắt cụt đầu cùng C được nêu trên đây đối với polypeptit esPH20 của người. Như vậy, polypeptit esPH20 của tinh tinh được đề xuất trong bản mô tả này chứa axit amin tương ứng với các gốc axit amin từ 1 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 hoặc 501 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107.

Polypeptit PH20 của tinh tinh có thể được căn trình tự với polypeptit PH20 của người bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp này thường làm tối đa hóa sự khớp, và bao gồm các phương pháp như sử dụng kỹ thuật căn trình tự thủ công và sử dụng nhiều chương trình căn trình tự có sẵn (ví dụ, BLASTP) và các chương trình khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Fig.1 cung cấp sự căn trình tự polypeptit tiền chất của PH20 người và tinh tinh. Các gốc axit amin từ 491 đến 500 của PH20 người (mà ở đó polypeptit esPH20 của người được đề xuất trong bản mô tả này được cắt cụt so với polypeptit PH20 kiểu dại của người) tương ứng với các gốc axit amin 491 đến 501 của PH20 tinh tinh. Như vậy, được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit esPH20 của tinh

tinh chứa các gốc axit amin từ 1 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 hoặc 501 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 197. Khi được biểu hiện trong hệ biểu hiện của động vật có vú, peptit tín hiệu bao gồm 35 axit amin được phân cắt trong quá trình xử lý, và dạng trưởng thành của protein được tiết. Như vậy, polypeptit esPH20 trưởng thành của tinh tinh chứa các axit amin từ 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 hoặc 501 của SEQ ID NO:197.

Polypeptit PH20 của tinh tinh nêu làm ví dụ là polypeptit chứa các gốc axit amin từ 1 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 hoặc 498 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:197. Khi được biểu hiện trong hệ biểu hiện của động vật có vú, peptit tín hiệu gồm 35 axit amin này được phân cắt trong quá trình xử lý, và dạng trưởng thành của protein được tiết. Như vậy, polypeptit esPH20 trưởng thành của tinh tinh chứa các axit amin từ 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, hoặc 498 của SEQ ID NO:197.

D. Polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N

Sáng chế đề xuất hyaluronidaza được glycosyl hóa một phần tại vị trí N, bao gồm polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần, mà vẫn giữ được tất cả hoặc một phần của hoạt tính hyaluronidaza của hyaluronidaza được glycosyl hóa tại vị trí N. Hyaluronidaza được khử glycosyl hóa nêu làm ví dụ bao gồm polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần từ loại bất kỳ, như polypeptit bất kỳ được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng. Biến thể alen và các biến thể khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm polypeptit có độ tương đồng trình tự 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc nhiều hơn với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: NO:107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc dạng cắt cụt của chúng. Hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này còn bao gồm hyaluronidaza lai, dung hợp và khảm được khử glycosyl hóa một phần, và các thể liên hợp hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần.

Hyaluronidaza được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Như vậy, mặc dù tất cả các vị trí glycosyl hóa được liên kết với N (như, ví dụ, các vị trí ở axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của PH20 người, được nêu làm ví dụ trong SEQ ID NO:107) có thể được glycosyl hóa, nhưng mức độ glycosyl hóa được làm giảm so với

hyaluronidaza không được cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Polypeptit hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit PH20 tan được được khử glycosyl hóa một phần, có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn. Trong một ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được khử glycosyl hóa một phần, để cho chúng không còn chứa manoza bậc cao hoặc glycan loại phức hợp, nhưng chứa ít nhất một gốc N-axetylglucosamin. Trong một số ví dụ, 1, 2 hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166 và N254 của SEQ ID NO: 107 được khử glycosyl hóa, tức là, chúng không chứa gốc đường. Trong các ví dụ khác, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa. Các gốc axit amin được glycosyl hóa tối thiểu chứa một gốc N-axetylglucosamin.

Sáng chế đề xuất polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này thiếu một hoặc nhiều axit amin từ đầu cùng C của polypeptit PH20 chiều dài đầy đủ, như polypeptit bất kỳ trong số polypeptit được nêu trong SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cắt cụt ở đầu cùng C bởi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 axit amin hoặc nhiều hơn so với polypeptit kiểu dại chiều dài đầy đủ, như polypeptit kiểu dại chiều dài đầy đủ với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198. Trong một số ví dụ, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa. Các gốc axit amin được glycosyl hóa tối thiểu chứa một gốc N-axetylglucosamin. Trong các ví dụ khác, 1, 2 hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 không được glycosyl hóa. Trong các ví dụ khác, mức độ glycosyl hóa có thể được làm giảm, để cho, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần không chứa manoza bậc cao và glycan loại phức hợp, nhưng chúng chứa ít nhất một gốc N-axetylglucosamin, miễn là chúng vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza. Do đó,

polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng Cđược glycosyl hóa hoàn toàn.

Polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần và polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza. Ngoài ra, polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần và polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng Ccó hoạt tính trung tính, tức là, chúng vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza ở độ pH trung tính. Hoạt tính hyaluronidaza có thể được tăng hoặc giảm so với polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C và polypeptit PH20 chiều dài đầy đủ được glycosyl hóa. Ví dụ, polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần và polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza là 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C và polypeptit PH20 chiều dài đầy đủ được glycosyl hóa.

Như vậy, polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm polypeptit trị liệu, như để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan. Polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần và polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C cũng có thể được sử dụng, ví dụ, trong trị liệu kết hợp.

1. Polypeptit PH20

Hyaluronidaza được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này nêu làm ví dụ bao gồm polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần từ loại bất kỳ, như polypeptit bất kỳ được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng. Biến thể alen và các biến thể khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm polypeptit có độ tương đồng trình tự bằng 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc nhiều hơn với bất kỳ trong số SEQ ID NO: NO:107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc dạng cắt cụt của chúng. Trong một số ví dụ, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa. Trong các ví dụ khác, 1, 2, hoặc 3 vị trí N-

glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166 và N254 của SEQ ID NO: 107 không được glycosyl hóa. Trong một số ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 tối thiểu chứa một gốc N-axetylglucosamin.

Hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Như vậy, mặc dù tất cả các vị trí glycosyl hóa được liên kết với N (như, ví dụ, các vị trí ở axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của PH20 của người, được nêu làm ví dụ trong SEQ ID NO:107) có thể được glycosyl hóa, mức độ glycosyl hóa được làm giảm so với hyaluronidaza không được cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Cụ thể, hylaruonidaza được glycosyl hóa một phần vẫn giữ được ít nhất một gốc N-axetylglucosamin ở mỗi vị trí glycosyl hóa được liên kết với N. Hyaluronidaza được glycosyl hóa một phần có thể được glycosyl hóa ở 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107. Trong một số ví dụ, hyaluronidaza được khử glycosyl hóa ở 1, 2, hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với các gốc axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107. Polypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn.

Glycosidaza, hoặc glycozit hydrolaza, là enzym xúc tác quá trình thủy phân của liên kết glycosit để tạo ra hai đường nhỏ hơn. Như được thể hiện trên Fig.2, các loại chính của N-glycan ở động vật có xương sống bao gồm glycan manoza bậc cao, glycan lai và glycan phức hợp. Có một vài glycosidaza mà chỉ tạo ra sự khử glycosyl hóa protein một phần, bao gồm: EndoF1, mà phân cắt manoza bậc cao và glycan loại lai; EndoF2, mà phân cắt glycan loại phức hợp hai nhánh; EndoF3, mà phân cắt glycan phức hợp hai nhánh và nhiều nhánh hơn; và EndoH, mà phân cắt manoza bậc cao và glycan loại lai (Fig.3). Việc xử lý hyaluronidaza, như hyaluronidaza tan được, như PH20 tan được, bằng một hoặc tất cả các glycosidaza này có thể chỉ tạo ra sự khử glycosyl hóa một phần, do đó, vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza.

Ví dụ, việc xử lý rHuPH20 bằng một hoặc tất cả các glycosidaza này tạo ra sự khử glycosyl hóa một phần. Các rHupolypeptit PH20 được khử glycosyl hóa một phần thể

hiện hoạt tính enzym hyaluronidaza mà có thể so sánh được với polypeptit được glycosyl hóa hoàn toàn (xem chẳng hạn Ví dụ 7). Trái lại, việc xử lý rHuPH20 (SEQ ID NO:122) bằng PNGaseF, là glycosidaza phân cắt tất cả các N-glycan (xem Fig.3), hoặc việc xử lý bằng chất ức chế GlcNAc phosphotransferaza (GPT) tunicamyxin, tạo ra sự khử glycosyl hóa hoàn toàn của tất cả các N-glycan và do đó làm cho PH20 không có hoạt tính enzym (xem chẳng hạn, Ví dụ 7-8, dưới đây).

Polypeptit hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit PH20 tan được được khử glycosyl hóa một phần, có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn. Thông thường, hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần, bao gồm polypeptit PH20 tan được được khử glycosyl hóa một phần, được đề xuất trong bản mô tả này thể hiện hoạt tính hyaluronidaza bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn.

Hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này còn bao gồmhyaluronidaza lai, dung hợp và khảm được khử glycosyl hóa một phần, và các thể liên hợp hyaluronidaza được khử glycosyl hóa một phần.

2. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C

Ví dụ về, peptit PH20 được glycosyl hóa một phần tại vị trí N, hoặc được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này thiếu một hoặc nhiều axit amin từ đầu cùng C của polypeptit PH20 chiều dài đầy đủ như được nêu trong SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cắt cụt ở đầu cùng C bởi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 axit amin hoặc nhiều hơn so với polypeptit kiểu dại chiều dài đầy đủ, như polypeptit kiểu dại chiều dài đầy đủ với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:107-109, 111-120, 197 và 198. Trong một số ví dụ, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107, được glycosyl hóa. Trong các ví dụ

khác, 1, 2, hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166 và N254 của SEQ ID NO: 107, không được glycosyl hóa.

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Mặc dù tất cả các vị trí glycosyl hóa được liên kết với N (như, ví dụ, các vị trí ở axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của PH20 của người, được nêu làm ví dụ trong SEQ ID NO:107) có thể được glycosyl hóa, mức độ glycosyl hóa được làm giảm so với hyaluronidaza không được cắt bằng một hoặc nhiều glycosidaza. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn. Cụ thể, hylaruonidaza được glycosyl hóa một phần tại vị trí Nvẫn giữ được ít nhất một gốc N-axetylglucosamin ở mỗi vị trí glycosyl hóa được liên kết với N. Trong một số ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 tối thiểu chứa một gốc N-axetylglucosamin. Trong các ví dụ khác, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa ở mức glycosyl hóa của hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn ở mỗi trong số 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa. Trong các ví dụ khác, 1, 2, hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được khử glycosyl hóa hoàn toàn. Trong các ví dụ này, thông thường, axit amin N82, N166 hoặc N254 được khử glycosyl hóa hoàn toàn.

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N nêu làm ví dụ là từ loại bất kỳ, như polypeptit bất kỳ được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng. Biến thể alen và các biến thể khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm polypeptit có độ tương đồng trình tự bằng 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc nhiều hơn với bất kỳ trình tự trong số SEQ ID NO: NO:107-120, 197 và 198, hoặc dạng cắt cụt của chúng. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này còn bao gồm polypeptit PH20 lai, dung hợp và khảm, và các

thể liên hợp PH20. Ví dụ, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể được liên hợp với polyme, như dextran, gốc polyetylen glycol (PEGyl hóa (PEG)) hoặc gốc sialyl, hoặc các polyme khác, như polyme đường và polyme tự nhiên. Trong các ví dụ khác, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được liên kết hoặc được dung hợp với miền như miền Fc từ globulin miễn dịch IgG.

Được bao gồm trong số các polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa hoặc được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này là các polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng C bởi từ 2 axit amin đến 44 axit amin so với PH20 kiểu dại được nêu trong SEQ ID NO:107 (polypeptit tiền chất) hoặc 108 (polypeptit trưởng thành), hoặc biến thể alen hoặc các biến thể loài của chúng. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng Cbao gồm polypeptit bất kỳ có các phần cắt cụt đầu cùng C để tạo ra polypeptit chứa từ axit amin 1 đến axit amin 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 hoặc 507 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107, hoặc các vị trí tương ứng trong biến thể alen hoặc biến thể loài của chúng, với 2, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107, được glycosyl hóa. Khi được biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, trình tự tín hiệu đầu cùng N bao gồm 35 axit amin được phân cắt trong quá trình xử lý, và dạng trưởng thành của protein được tiết. Như vậy, sáng chế còn đề xuất polypeptit PH20 trưởng thành được cắt cụt ở đầu cùng C chứa axit amin từ 36 đến 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 hoặc 507 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107 hoặc các vị trí tương ứng trong biến thể alen hoặc biến thể loài của chúng, với 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107, được glycosyl hóa.

Bảng 2 cung cấp các ví dụ không giới hạn về polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C nêu làm ví dụ mà có thể được glycosyl hóa hoặc được khử glycosyl hóa một phần.

Trong Bảng 2 dưới đây, chiều dài (tính bằng axit amin) của polypeptit tiền chất và trưởng thành, và trình tự xác định (SEQ ID NO) trong đó trình tự axit amin nêu làm ví dụ của polypeptit tiền chất và trưởng thành của protein PH20được cắt cụt ở đầu cùng C được nêu, được cung cấp. Polypeptit PH20 kiểu dại cũng được bao gồm trong Bảng 2 để so sánh.

Bảng 2. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C nêu làm ví dụ

Polypeptit	Tiền chất (axit amin)	Tiền chất SEQ ID NO	Trưởng thành (axit amin)	Trưởng thành SEQ ID NO
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-ISSV	506	45	471	97
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-LIIS	504	46	469	98
SPAM1-FLII	503	5	468	57
SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-MFIV	496	50	461	102
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-ATMF	494	51	459	103
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-LSAT	492	52	457	104
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-SPST	488	53	453	105
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-NASP	486	54	451	106
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69
SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71
SPAM1-EPQI	480	20	445	72
SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76

SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83
SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-GDVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa tại vị trí N và được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm các polypeptit tan được, tức là phân bố vào pha nước của dung dịch Triton® X-114, và các polypeptit không tan được, tức là phân bố vào pha chất tẩy rửa của dung dịch Triton® X-114. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn. Theo cách khác, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần có thể có 1, 2 hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166 và N254 của SEQ ID NO: 107, mà không được glycosyl hóa. Một cách tối thiểu, để được glycosyl hóa, vị trí N-glycosyl hóa phải chứa ít nhất một gốc N-axetylglucosamin.

Trong một số ví dụ, polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này là tan được, tức là, không được gắn neo GPI. Điều này có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm Triton®X-114 sau khi ủ với PI-PLC hoặc PI-PLD, như được nêu dưới đây và trong Ví dụ 4. Ví dụ, polypeptit PH20 mà được cắt cụt đầu cùng Ctại hoặc đầu 5' đối với vị trí axit amin tương ứng với vị trí gốc axit amin 490 của polypeptit PH20 được nêu trong SEQ ID NO:107

thường tan được khi được biểu hiện trong hệ biểu hiện của động vật có vú (xem, chẳng hạn Ví dụ 3). Các polypeptit này là tan được bởi vì chúng khuyết hoàn toàn trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Trong các ví dụ khác, polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng Cđược glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này là không tan được và được liên kết màng khi được biểu hiện trong hệ biểu hiện của động vật có vú. Ví dụ, polypeptit PH20 mà được cắt cụt ở đầu cùng Ctại hoặc đầu 3' của vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 500 của polypeptit PH20 được nêu trong SEQ ID NO:107 thường không tan được khi được biểu hiện trong hệ biểu hiện của động vật có vú (xem, chẳng hạn Ví dụ 3). Polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này có thể được glycosyl hóa một phần trong đó 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa.

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần tan được được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm các polypeptit mà được cắt cụt nhưng vẫn giữ được ít nhất một hoặc nhiều gốc axit amin được định vị trong tín hiệu gắn neo GPI, và các polypeptit mà thiếu hoàn toàn trình tự tín hiệu gắn neo GPI và vị trí ω. Như vậy, thay vì có neo GPI được gắn theo cách cộng hóa trị với đầu cùng C của protein trong ER và được gắn neo với mảnh nhỏ ngoại bào của màng huyết tương, các polypeptit này được tiết. Các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C tan được này có thể được glycosyl hóa một phần để cho 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa được glycosyl hóa. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C tan được nêu làm ví dụ mà thiếu trình tự tín hiệu gắn neo GPI là polypeptit từ loại bất kỳ, như polypeptit bất kỳ được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 và 198, hoặc biến thể alen hoặc các biến thể khác của chúng. Các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng Cđược glycosyl hóa một phần tan được này có các phần cắt cụt ở đầu cùng C để tạo ra polypeptit chứa axit amin từ 1 đến 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Trong quá trình phân cắt trình tự tín hiệu đầu cùng N sau khi biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng Cđược glycosyl hóa một phần tan được trưởng thành chứa axit amin từ 36 đến 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463,

464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Trong một số ví dụ, polypeptit PH20 tan được được cắt cụt trình tự tín hiệu gắn neo GPI ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần, chứa, ví dụ, ít nhất một N-axetylglucosamin ở 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107. Trong các ví dụ khác, polypeptit PH20 tan được được cắt cụt trình tự tín hiệu gắn neo GPI ở đầu cùng C có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn.

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần mà vẫn giữ ít nhất một axit amin trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit PH20 kéo dài tan được được khử glycosyl hóa một phần. Trong một số ví dụ, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần không được glycosyl hóa ở 1, 2 hoặc 3 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166 và N254 của SEQ ID NO: 107. Các polypeptit PH20 kéo dài tan được được khử glycosyl hóa một phần này chứa các axit amin từ 1 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Khi được biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, trình tự tín hiệu đầu cùng N bao gồm 35 axit amin được phân cắt trong quá trình xử lý, và dạng trưởng thành của protein được tiết. Như vậy, dạng trưởng thành của polypeptit esPH20 được khử glycosyl hóa một phần chứa các axit amin từ 36 đến 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 hoặc 500 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 107. Dạng trưởng thành ở người của polypeptit esPH20 được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm các dạng được nêu trong SEQ ID NO: 59-63 và 100-104 chứa ít nhất một N-axetylglucosamin ở 3, 4, 5 hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107. Trong một số ví dụ, mức độ glycosyl hóa được làm giảm bằng cách xử lý bằng endoglycosidaza. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần chứa ít nhất một axit amin trong trình tự tín hiệu gắn neo GPI được đề xuất trong bản mô tả này có thể có mức glycosyl hóa bằng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn.

Sáng chế còn đề xuất polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần mà không tan được, tức là, chúng được gắn với màng tế bào và do vậy không được tiết vào môi trường trong quá trình biểu hiện. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C mà không tan được có thể được khử glycosyl hóa một phần miễn là chúng vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C trưởng thành được glycosyl hóa một phần nêu làm ví dụ mà không tan được là các polypeptit chứa các axit amin tương ứng với các vị trí axit amin từ 36 đến 501, 502, 503, 504, 505, 506 hoặc 507 của SEQ ID NO:107. Do đó, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này mà không tan được bao gồm các polypeptit có chiều dài là 466, 467, 468, 469, 470, 471 hoặc 472 axit amin, như các polypeptit được nêu trong các SEQ ID NO: 55-58 và 97-99, mà vẫn có mức glycosyl hóa ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% hoặc 80% so với hyaluronidaza được glycosyl hóa hoàn toàn. Trong một số ví dụ, 3, 4, 5, hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107 được glycosyl hóa. Trong các ví dụ khác, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 vị trí N-glycosyl hóa, tương ứng với axit amin N82, N166, N235, N254, N368, và N393 của SEQ ID NO: 107, chứa ít nhất một gốc N-axetylglucosamin.

Polypeptit được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza mà tăng hoặc giảm so với dạng được gắn neo GPI kiểu dại của PH20. Ngoài ra, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được khử glycosyl hóa một phần là có hoạt tính trung tính, tức là, chúng giữ được hoạt tính hyaluronidaza ở độ pH trung tính. Ví dụ, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này có thể thể hiện hoạt tính hyaluronidaza bằng 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% hoặc nhiều hơn so với hoạt tính hyaluronidaza được thể hiện bởi dạng kiểu dại được gắn neo GPI. Trong một số ví dụ, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được glycosyl hóa một phần thể hiện hoạt tính hyaluronidaza được tăng so với dạng kiểu dại được gắn neo GPI.

Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được glycosyl hóa tại vị trí N. Hyaluronidaza được glycosyl hóa tại vị trí N và được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này còn bao

gồmhyaluronidaza lai, dung hợp và khảm được glycosyl hóa tại vị trí N và được khử glycosyl hóa một phần, và các thể liên hợp hyaluronidaza được glycosyl hóa tại vị trí N và được khử glycosyl hóa một phần .

3. Các cải biến khác

Polypeptit PH20 được bao gồm trong bản mô tả này, kể cả polypeptit esPH20 của người, polypeptit PH20 được glycosyl hóa tại vị trí N và được glycosyl hóa một phần tại vị trí Nđược cắt cụt ở đầu cùng C và polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần, còn bao gồm các polypeptit chứa các cải biến hóa học hoặc cải biến sau dịch mã và các polypeptit không chứa các cải biến hóa học hoặc cải biến sau dịch mã. Các cải biến như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, quá trình PEGyl hóa, sialyl hóa, albumin hóa, glycosyl hóa, farnysyl hóa, carboxyl hóa, hydroxy hóa, phosphoryl hóa, và các cải biến polypeptit khác đã biết trong lĩnh vực. Như vậy, polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C, bao gồm polypeptit esPH20, được đề xuất trong bản mô tả này có thể chứa các cải biến khác mà là hoặc không phải là trong trình tự cơ bản của polypeptit, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các cải biến của gốc hydrat cacbon, gốc polyetylen glycol (PEG), gốc sialyl hóa, miền Fc từ globulin miễn dịch G, hoặc miền hoặc gốc bất kỳ khác. Ví dụ, các cải biến khác này có thể được thực hiện để làm tăng độ ổn định hoặc thời gian bán hủy khỏi huyết thanh của protein. Polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C, bao gồm polypeptit esPH20, được đề xuất trong bản mô tả này có thể được liên hợp hoặc được dung hợp với gốc bất kỳ bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm các phương pháp hóa học và tái tổ hợp, với điều kiện là polypeptit thu được vẫn giữ được hoạt tính hyaluronidaza.

Khả năng sinh miễn dịch được giảm

Polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit esPH20 của người, có thể được thực hiện để có khả năng sinh miễn dịch được giảm. Khả năng sinh miễn dịch được giảm có thể được tác động bằng cách thay đổi trình tự mà loại bỏ epitop kháng nguyên khỏi polypeptit hoặc bằng cách thay đổi các cải biến sau dịch mã. Ví dụ, được bao gồm là việc thay đổi sự glycosyl hóa của peptit, với điều kiện là polypeptit tối thiểu chứa ít nhất một N-axetylglucosamin ở các gốc axit amin N235, N368 và N393 của SEQ ID NO:107.

Ví dụ, polypeptit PH20 có thể được cải biến để cho chúng thiếu fucoza, cụ thể là sự bifucosyl hóa. Cụ thể, polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này là không được bifucosyl hóa. Điều này có thể đạt được bằng cách biểu hiện và sản xuất polypeptit PH20 trong tế bào chủ, thường là tế bào chủ côn trùng, mà không thực hiện sự bifucosyl hóa. Fucoza là deoxyhexoza có mặt trong nhiều sinh vật, bao gồm động vật có vú, côn trùng và thực vật. Glycan được fucosyl hóa được tổng hợp bởi fucosyl-tranferaza. Xem, ví dụ, Ma et al., *Glycobiology*, 15(2):158R-184R, (2006); Nakayama et al., *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); và Sturla et al., *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005). Ở người, fucoza thường tồn tại dưới dạng cải biến đầu cùng đối với cấu trúc glycan, và sự có mặt của fucoza được liên kết ở vị trí α1,6 với N-axetylglucosamin được thấy là đóng vai trò quan trọng trong quá trình xử lý và nhận biết glycoprotein. Ở côn trùng, cấu trúc lõi N-glycan thể hiện sự bifucosyl hóa với liên kết ở vị trí α1,6 và α1,3. Sự fucosyl hóa lõi tế bào côn trùng với liên kết ở vị trí α1,3 tạo ra epitop hydrat cacbon mà gây miễn dịch ở người (xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20070067855). Ví dụ, polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit esPH20, có thể được tạo ra ở tế bào chủ không có khả năng bifucosyl hóa polypeptit. Như vậy, mặc dù có thể sử dụng tế bào côn trùng hoặc các tế bào khác mà có khả năng bifucosyl hóa để biểu hiện polypeptit, nhưng các tế bào của động vật có vú, như tế bào CHO, thường được sử dụng.

Trong một số ví dụ, polypeptit PH20 được khử fucosyl hóa, hoặc thiếu fucoza có thể được tạo ra ở tế bào côn trùng với các con đường glycosyl hóa được cải biến, thông qua việc sử dụng vectơ biểu hiện baculovirut chứa gen xử lý oligosacarit sinh vật nhân chuẩn, nhờ đó tạo ra hệ biểu hiện tế bào côn trùng "được động vật có vú hóa" (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,461,863). Theo cách khác, tính kháng nguyên có thể được loại bỏ bởi sự biểu hiện của polypeptit PH20 trong tế bào côn trùng thiếu α1,3-fucosyltransferaza (FT3) (xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20070067855). Trong các ví dụ khác, polypeptit PH20 được khử fucosyl hóa, hoặc thiếu fucoza có thể được tạo ra, ví dụ, trong các dòng tế bào mà tạo ra protein được khử fucosyl hóa, bao gồm tế bào CHO Lec13 thiếu hụt sự fucosyl hóa protein (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0157108; và WO 2004/056312), và dòng tế bào bất hoạt, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, tế bào CHO bất hoạt (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Sự liên hợp với polyme

Trong một số ví dụ, polypeptit esPH20 và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, bao gồm polypeptit PH20 được glycosyl hóa một phần, được đề xuất trong bản mô tả này được liên hợp với polyme. Polyme nêu làm ví dụ mà có thể được liên hợp với polypeptit PH20, bao gồm homopolyme tự nhiên và tổng hợp, như polyol (tức là poly-OH), polyamin (tức là poly-NH_2) và axit polycarboxylic (tức là poly-COOH), và các heteropolyme khác tức là polyme bao gồm một hoặc nhiều nhóm liên hợp khác nhau, *ví dụ* nhóm hydroxyl và nhóm amin. Ví dụ về phân tử polyme thích hợp bao gồm phân tử polyme được chọn từ trong số các polyalkylen oxit (PAO), như polyalkylen glycol (PAG), bao gồm polyetylen glycol (PEG), metoxypolyetylen glycol (mPEG) và polypropylen glycol, PEG-glyxidyl ete (Epox-PEG), PEG-oxycarbonylimidazol (CDI-PEG), polyetylen glycol mạch nhánh (PEG), rượu polyvinyl (PVA), polycacboxylat, polyvinylpyrolidon, axit poly-D,L-amino, anhydrit của axit polyetylen-co-maleic, anhydrit của axit polystyren-co-maleic, dextranbao gồm carboxymetyl-dextran, heparin, albumin tương đồng, xenluloza, bao gồm metylxenluloza, carboxymetylxenluloza, etylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, carboxyetylxenluloza và hydroxypropylxenluloza, sản phẩm thủy phân của chitosan, tinh bột như hydroxyetyl-tinh bột và hydroxypropyl-tinh bột, glycogen, agaroza và dẫn xuất của chúng, gôm guar, pullulan, inulin, gôm xantan, carrageenan, pectin, sản phẩm thủy phân của axit alginic và bio-polyme.

Thông thường, polyme là polyalkylen oxit (PAO), như polyetylen oxit, như PEG, thường là mPEG, mà, so với polysacarit như dextran, pullulan và các polysacarit tương tự, có ít nhóm dễ phản ứng có khả năng liên kết chéo. Thông thường, polyme là phân tử polyme không độc như (metoxy)polyetylen glycol (mPEG) mà có thể được liên hợp cộng hóa trị với polypeptit esPH20 và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác (*ví dụ*, với nhóm gắn kết trên bề mặt protein) bằng cách sử dụng phương pháp hóa học tương đối đơn giản.

Phân tử polyme thích hợp để gắn với polypeptit esPH20 và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG) và dẫn xuất PEG như metoxy-polyetylen glycol (mPEG), PEG-glyxidyl ete (Epox-PEG), PEG-oxycarbonylimidazol (CDI-PEG), PEG mạch nhánh, và polyetylen oxit (PEO) (xem *ví dụ* Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476;

Harris and Zalipsky (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 and Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; và Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). Phân tử polyme có thể có khối lượng phân tử thường nằm trong khoảng từ khoảng 3 kDa đến khoảng 60 kDa. Theo một số phương án phân tử polyme mà được liên hợp với polypeptit PH20 được đề xuất trong bản mô tả này có khối lượng phân tử bằng 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 hoặc lớn hơn 60 kDa.

Các phương pháp khác nhau để cải biến polypeptit bằng cách gắn kết (liên hợp) cộng hóa trị PEG hoặc dẫn xuất PEG (tức là "PEGylhóa") là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem ví dụ, U.S. 2006/0104968; U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; và U.S. 2004/0235734). Các kỹ thuật để PEGyl hóa bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, cầu nối chuyên dụng và phương pháp hóa học liên hợp (xem ví dụ, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), gắn kết nhiều gốc PEG vào một vị trí liên hợp (như thông qua việc sử dụng PEG mạch nhánh; xem ví dụ, Veronese et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGyl hóa đặc hiệu vị trí và/hoặc mono-PEGyl hóa (xem ví dụ, Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999), và PEGyl hóa enzym hướng vị trí (xem ví dụ, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (ngoài ra, xem, ví dụ, tài liệu Lu and Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu và Felix (1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu *et al.* (1995) *J Immunol.* 154:3088-95; ngoài ra, xem, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 và Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Các phương pháp và kỹ thuật được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra protein có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều hơn 10 PEG hoặc dẫn xuất PEG được gắn với phân tử protein đơn (xem ví dụ, U.S. 2006/0104968).

Nhiều chất phản ứng để PEGyl hóa được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất phản ứng như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, PEG được hoạt hóa N-hydroxysucxinimidyl (NHS), sucxinimidyl mPEG, mPEG2-N-hydroxysucxinimit, mPEG sucxinimidyl alpha-metylbutanoat, mPEG sucxinimidyl propionat, mPEG sucxinimidyl butanoat, sucxinimidyl este của axit mPEG carboxymetyl 3-

hydroxybutanoic, PEG-sucxinimidyl propionat đồng hai chức năng, PEG propionaldehyt đồng hai chức năng, PEG butyraldehyt đồng hai chức năng, PEG maleimit, PEG hydrazit, p-nitrophenyl-carbonat PEG, mPEG-benzotriazol carbonat, propionaldehyt PEG, mPEG butryaldehyt, mPEG2 butyraldehyt mạch nhánh, mPEG axetyl, mPEG piperidon, mPEG metylketon, mPEG "không cầu nối" maleimit, mPEG vinyl sulfon, mPEG thiol, mPEG orthopyridylthioeste, mPEG orthopyridyl disulfua, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinylsulfon PEG-NHS, acrylat PEG-NHS, fluorescein PEG-NHS, và biotin PEG-NHS (xem ví dụ, 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. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; và WO 0187925).

Các cải biến khác

Polypeptit esPH20 và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác được đề xuất trong bản mô tả này còn bao gồm thể dung hợp và các thể liên hợp của chúng.

E.Các phương pháp sản xuất axit nucleic mã hóa PH20 kéo dài tan được và các hyaluronidaza PH20 tan được khác, và polypeptit của chúng

Polypeptit của PH20 kéo dài tan được, PH20 hyaluronidaza được cắt cụt ở đầu cùng C, và PH20 hyaluronidaza được glycosyl hóa một phần được nêu trong bản mô tả này, và phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit này, có thể thu được bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu hiện protein tái tổ hợp và tinh chế protein. Ví dụ, ADN có thể thu được từ ADN được tách dòng (ví dụ từ thư viện ADN), bằng quá trình tổng hợp hóa học, bằng cách tách dòng cADN, hoặc bằng cách tách dòng

ADN hệ gen hoặc mảnh của chúng, được tinh chế từ tế bào mong muốn. Khi polypeptit được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp, phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định axit nucleic mã hóa các gen mong muốn có thể được sử dụng. Phương pháp bất kỳ có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để thu được cADN chiều dài đầy đủ (tức là bao gồm toàn bộ vùng mã hóa) hoặc ADN hệ gen mã hóa enzym PH20 mong muốn, như từ nguồn tế bào hoặc mô. Dạng được cải biến hoặc biến thể, bao gồm dạng cắt cụt như được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được thao tác từ polypeptit kiểu dại sử dụng các phương pháp ADN tái tổ hợp chuẩn.

Polypeptit có thể được tách dòng hoặc được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp có sẵn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực tách dòng và phân lập phân tử axit nucleic. Các phương pháp này bao gồm phương pháp khuếch đại PCR các axit nucleic và sàng lọc các thư viện, bao gồm sàng lọc bằng việc lai axit nucleic, sàng lọc dựa vào kháng thể và sàng lọc dựa vào hoạt tính.

Các phương pháp khuếch đại axit nucleic có thể được sử dụng để phân lập các phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit mong muốn, bao gồm, ví dụ, phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). PCR có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp và quy trình trong lĩnh vực. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm sử dụng máy chu kỳ nhiệt Perkin-Elmer Cetusvà Taq polymeraza (Gene Amp). Axit nucleic chứa vật liệu có thể được sử dụng làm vật liệu bắt đầu mà phân tử axit nucleic mã hóapolypeptit mong muốn có thể được phân lập từ đó. Ví dụ, chế phẩm ADN và mARN, dịch chiết tế bào, dịch chiết mô từ nguồn thích hợp (ví dụ, tinh hoàn, tuyến tiên liệt, tuyến vú), mẫu dịch (ví dụ, máu, huyết thanh, nước bọt), mẫu từ đối tượng khoẻ mạnh và/hoặc đối tượng mắc bệnh có thể được sử dụng trong các phương pháp khuếch đại. Nguồn này có thể là từ các loài sinh vật nhân chuẩn bất kỳ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, động vật có xương sống, động vật có vú, người, lợn, bò, mèo, chim, ngựa, chó và các nguồn linh trưởng khác. Các thư viện axit nucleic cũng có thể được sử dụng làm nguồn vật liệu bắt đầu. Đoạn mồi có thể được thiết kế để khuếch đại polypeptit mong muốn. Ví dụ, đoạn mồi có thể được thiết kế dựa vào trình tự được biểu hiện mà polypeptit mong muốn được tạo ra từ đó. Đoạn mồi có thể được thiết kế dựa vào sự dịch mã ngược trình tự axit amin của polypeptit. Nếu muốn, đoạn mồi suy biến có thể được sử dụng để khuếch đại. Các

đoạn mồi oligonucleotit mà lai với các trình tự tại các đầu cùng 3' và 5' của trình tự mong muốn có thể được sử dụng làm các đoạn mồi để khuếch đại bằng PCR các trình tự từ mẫu axit nucleic. Các mối có thể được sử dụng để khuếch đại PH20 có chiều dài đầy đủ hoàn chỉnh, hoặc trình tự được cắt cụt của nó, như axit nucleic mã hóa các polypeptit PH20 tan được bất kỳ được đề xuất ở đây. Phân tử axit nucleic được tạo ra bằng cách khuếch đại có thể được giải trình tự và được xác nhận là mã hóa polypeptit mong muốn.

Cáctrình tự nucleotit bổ sung có thể được liên kết với phân tử axit nucleic mã hóapolypeptit, bao gồm trình tự cầu nối chứa các vị trí endonucleaza giới hạn nhằm mục đích tách dòng gen tổng hợp vào vectơ, ví dụ, vectơ biểu hiện protein hoặc vectơ được thiết kế để khuếch đại trình tự ADN mã hóa protein lõi. Ngoài ra, trình tự nucleotit bổ sung định rõ các yếu tố ADN chức năng có thể được liên kết hoạt động với phân tử axit nucleic mã hóapolypeptit. Ví dụ về các trình tự như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi động được thiết kế để thúc đẩy việc biểu hiện protein nội bào, và trình tự tiết, ví dụ như trình tự tín hiệu khác loại, được thiết kế để thúc đẩy việc tiết protein. Các trình tự như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, trình tự tín hiệu khác loại nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự tín hiệu khác loại kappa IgG ở người và chuột được nêu lần lượt trong SEQ ID NO:144 và 145. Trình tự gốc nucleotit bổ sung như trình tự bazơ định rõ vùng liên kết protein cũng có thể được liên kết với các phân tử axit nucleic mã hóaenzym. Cácvùng như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự gốc mà thúc đẩy hoặc mã hóa protein mà thúc đẩy việc hấp thu enzym vào tế bào đích cụ thể, hoặc theo cách khác, làm thay đổi tính chất dược động học của sản phẩm của gen tổng hợp.

Ngoài ra, thẻ hoặc các gốc khác có thể được bổ sung, ví dụ, để hỗ trợ việc phát hiện hoặc tinh chế polypeptit dựa vào ái lực. Ví dụ, trình tự gốc nucleotit bổ sung như trình tự bazơ định rõ thẻ epitop hoặc chỉ thị có thể phát hiện được khác cũng có thể được liên kết với các phân tử axit nucleic mã hóaenzym. Ví dụ về các trình tự như vậy bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa thẻ His (ví dụ, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO:142) hoặc thẻ Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO:143).

Sau đó, các axit nucleic được nhận diện và được phân lập có thể được chèn vào vectơ tách dòng thích hợp. Số lượng lớn hệ vectơ-vật chủ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Vectơ thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, plasmit hoặc virut

được cải biến, tuy nhiên, hệ vectơ cần phải tương thích với tế bào chủ được sử dụng. Các vectơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thể thực khuẩn như dẫn xuất lamda, hoặc plasmit như pCMV4, pBR322 hoặc dẫn xuất plasmit pUC hoặc vectơ Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Các vectơ biểu hiện khác bao gồm vectơ biểu hiện HZ24 được nêu ví dụ trong bản mô tả này (được nêu trong SEQ ID NO:140). Việc chèn vào vectơ tách dòng có khả năng, ví dụ, được thực hiện bằng cách nối mảnh ADN vào vectơ tách dòng có các đầu cùng kết dính bổ sung. Nếu vị trí giới hạn bổ sung được sử dụng để phân mảnh ADN không có mặt trong vectơ tách dòng, các đầu của phân tử ADN có thể được cải biến bằng enzym. Theo cách khác, vị trí mong muốn bất kỳ có thể được tạo ra bằng cách nối trình tự nucleotit (cầu nối) lên các đầu cùng ADN; các cầu nối được nối này có thể chứa các oligonucleotit đặc hiệu được tổng hợp bằng phương pháp hóa học mã hóa trình tự nhận biết endonucleaza giới hạn. Trong phương pháp thay thế, gen protein và vectơ được phân cắt có thể được cải biến bằng cách gắn đuôi homopolyme. Việc chèn có thể được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ tách dòng TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA).

Phân tử tái tổ hợp có thể được đưa vào tế bào chủ thông qua, ví dụ, quá trình biến nạp, chuyển nhiễm, lây nhiễm, xung điện và kỹ thuật siêu âm, để tạo ra nhiều bản sao của trình tự gen. Theo các phương án cụ thể, sự biến nạp của tế bào chủ với phân tử ADN tái tổ hợp mà kết hợp gen protein được phân lập, cADN, hoặc trình tự ADN được tổng hợp cho phép tạo ra nhiều bản sao của gen. Như vậy, có thể thu được gen với lượng lớn bằng cách nuôi các thể biến nạp, phân lập phân tử ADN tái tổ hợp từ các thể biến nạp và, khi cần, thu lại gen được chèn từ ADN tái tổ hợp được phân tách.

Ngoài quá trình sản xuất tái tổ hợp, PH20 tan được, bao gồm esPH20 bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được sản xuất bằng quá trình tổng hợp peptit trực tiếp bằng cách sử dụng kỹ thuật pha rắn (xem ví dụ, Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc.*, 85:2149-2154). Quá trình tổng hợp protein *in vitro* có thể được tiến hành bằng cách sử dụng kỹ thuật thủ công hoặc bằng cách tự động hóa. Quá trình tổng hợp được tự động hóa có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng máy tổng hợp peptit Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) theo hướng dẫn được cung cấp bởi nhà sản xuất.

Các mảnh khác nhau của polypeptit có thể được tổng hợp theo cách hóa học một cách riêng rẽ và được kết hợp bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học.

1. Vectơ và tế bào

Để biểu hiện tái tổ hợp một hoặc nhiều protein mong muốn, như protein bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, axit nucleic chứa toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit mã hóa protein này có thể được chèn vào vectơ biểu hiện thích hợp, tức là, vectơ chứa các yếu tố cần thiết cho việc phiên mã và dịch mã trình tự mã hóa protein được chèn. Các tín hiệu phiên mã và dịch mã cần thiết cũng có thể được cung cấp bởi trình tự khởi động gốc cho gen enzym, và/hoặc các vùng tạo sườn của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa axit nucleic mã hóa enzym. Tế bào chứa vectơ này cũng được đề xuất. Tế bào này bao gồm tế bào sinh vật nhân chuẩn và tế bào sinh vật nhân sơ, và vectơ là vectơ bất kỳ thích hợp để sử dụng trong bản mô tả này.

Tế bào sinh vật nhân chuẩn và tế bào sinh vật nhân sơ, bao gồm tế bào nội mô, chứa vectơ được đề xuất. Tế bào như vậy bao gồm tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào nấm, cổ khuẩn, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào động vật. Tế bào được sử dụng để tạo ra protein của chúng bằng cách cho tế bào nêu trên sinh trưởng trong điều kiện trong đó protein được mã hóa được biểu hiện bởi tế bào này, và thu hồi protein được biểu hiện. Để đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này, ví dụ, enzym có thể được tiết vào môi trường.

Chủng tế bào chủ có thể được chọn về khả năng điều biến sự biểu hiện của trình tự được chèn hoặc khả năng xử lý protein được biểu hiện theo cách mong muốn. Các cải biến như vậy của polypeptit bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự axetyl hóa, carboxyl hóa, glycosyl hóa, phosphoryl hóa, lipit hóa và axyl hóa. Sự xử lý sau dịch mã có thể ảnh hưởng đến quá trình gấp nếp và/hoặc chức năng của polypeptit. Các tế bào chủ khác nhau, như, nhưng không bị giới hạn ở, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 và WI38 có bộ máy tế bào đặc hiệu và các cơ chế đặc trưng đối với hoạt tính sau dịch mã này và có thể được chọn để đảm bảo sự cải biến và xử lý chính xác protein được đưa vào. Thông thường, việc lựa chọn tế bào là tế bào có khả năng đưa sự glycosyl hóa được liên kết với N vào polypeptit được biểu hiện. Do đó, được đề xuất là tế bào sinh vật nhân chuẩn chứa vectơ. Ví dụ về tế bào sinh vật nhân chuẩn là tế bào của động vật có vú trứng

chuột đồng Trung Quốc (CHO). Ví dụ, tế bào CHO thiếu hụt dihydrofolat reductaza (ví dụ, tế bào DG44) được sử dụng để sản xuất polypeptit được đề xuất trong bản mô tả này. Lưu ý rằng sự biểu hiện ở vi khuẩn của PH20 kéo dài tan được hoặc PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này sẽ không tạo ra polypeptit có hoạt tính xúc tác, nhưng khi được kết hợp với bộ máy glycosyl hóa thích hợp, PH20 có thể được glycosyl hóa một cách nhân tạo.

Sáng chế đề xuất vectơ chứa trình tự nucleotit mã hóa hyaluronidaza polypeptit, bao gồm polypeptit PH20 kéo dài tan được và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C, được liên kết với trình tự tín hiệu tự nhiên hoặc khác loại, cũng như nhiều bản sao của chúng. Các vectơ có thể được chọn để biểu hiện protein enzym ở tế bào hoặc sao cho protein enzym được biểu hiện dưới dạng protein được tiết.

Nhiều hệ vật chủ-vectơ có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hóa protein. Các hệ vật chủ-vectơ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hệ tế bào động vật có vú được gây nhiễm bằng virut (ví dụ như virut đậu mùa, adenovirut và các virut khác); hệ tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng virut (ví dụ như baculovirut); các vi sinh vật như nấm men chứa vectơ nấm men; hoặc vi khuẩn được biến nạp với thể thực khuẩn, ADN, ADN plasmit, hoặc ADN cosmit. Các yếu tố biểu hiện của vectơ thay đổi về cường độ và đặc tính của chúng. Tuỳ thuộc vào hệ vật chủ-vectơ được sử dụng, yếu tố phiên mã và dịch mã bất kỳ trong số nhiều yếu tố phiên mã và dịch mã thích hợp có thể được sử dụng.

Các phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để chèn mảnh ADN vào vectơ có thể được sử dụng để tạo cấu trúc vectơ biểu hiện chứa gen khảm chứa tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp và trình tự mã hóa protein. Các phương pháp này có thể bao gồm kỹ thuật tổng hợp và ADN tái tổ hợp *in vitro* và các thể tái tổ hợp *in vivo* (tái tổ hợp di truyền). Sự biểu hiện của trình tự axit nucleic mã hóa protein, hoặc miền, dẫn xuất, mảnh hoặc chất đồng đẳng của chúng, có thể được điều hòa bởi trình tự axit nucleic thứ hai sao cho gen hoặc mảnh của chúng được biểu hiện trong vật chủ được biến nạp với (các) phân tử ADN tái tổ hợp. Ví dụ, sự biểu hiện của protein có thể được kiểm soát bởi trình tự khởi động/trình tự tăng cường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án cụ thể, trình tự khởi động là không tự nhiên so với gen mã hóa protein mong muốn. Trình tự khởi động mà có thể được sử dụng bao gồm nhưng không bị giới hạn ở trình tự khởi động sớm SV40 (Bernoist

and Chambon, *Nature290*:304-310 (1981)), trình tự khởi động được chứa trong đoạn lặp đầu cùng dài đầu 3' của virut saccôm Rous (Yamamoto *et al.Cell22*:787-797 (1980)), trình tự khởi động thymidin kinaza của virut herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA78*:1441-1445 (1981)), trình tự điều hòa của gen metallothionein (Brinster *et al.*, *Nature296*:39-42 (1982)); vectơ biểu hiện của sinh vật nhân sơ như trình tự khởi động b-lactamaza (Jay *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA78*:5543) hoặc trình tự khởi động *tac* (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA80*:21-25 (1983)); ngoài ra, xem "Useful Protein from Recombinant Bacteria": trong Scientific American *242*:79-94 (1980)); vectơ biểu hiện của thực vật chứa trình tự khởi động nopalin syntaza (Herrara-Estrella *et al.*, *Nature303*:209-213 (1984)) hoặc trình tự khởi động 35S ARN virut khảm ở cây súp lơ (Gardner *et al.*, *Axit nucleic Res.9*:2871 (1981)), và trình tự khởi động của enzym quang hợp ribuloza bisphosphat carboxylaza (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature310*:115-120 (1984)); yếu tố trình tự khởi động từ nấm men và các nấm khác như trình tự khởi động Gal4, trình tự khởi độngdehydrogenaza rượu, trình tự khởi động phosphoglyxerol kinaza, trình tự khởi động phosphataza kiềm, và các vùng kiểm soát phiên mã ở động vật sau đây mà có tính đặc hiệu mô và được sử dụng ở động vật chuyển gen: vùng kiểm soát gen elastaza I có hoạt tính trong tế bào tuyến nang tuyến (Swift *et al.*, *Cell38*:639-646 (1984); Ornitz*et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.50*:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology7*:425-515 (1987)); vùng kiểm soát gen insulin có hoạt tính trong tế bào beta tuyến tụy (Hanahan *et al.*, *Nature315*:115-122 (1985)), vùng kiểm soát gen globulin miễn dịch có hoạt tính trong tế bào lympho (Grosschedl *et al.*, *Cell38*:647-658 (1984); Adams *et al.*, *Nature318*:533-538 (1985); Alexander *et al.*, *Mol. Cell Biol.7*:1436-1444 (1987)), vùng kiểm soát virut khối u vú ở chuột có hoạt tính trong tế bào tinh hoàn, vú, lympho và dưỡng bào (Leder *et al.*, *Cell45*:485-495 (1986)), vùng kiểm soát gen albumin có hoạt tính ở gan (Pinckert *et al.*, *Genes và Devel.1*:268-276 (1987)), vùng kiểm soát gen alpha-fetoprotein có hoạt tính ở gan (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.5*:1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, *Science235*:53-58 1987)), vùng kiểm soát gen alpha-1 kháng trypsin có hoạt tính ở gan (Kelsey *et al.*, *Genes and Devel.1*:161-171 (1987)), vùng kiểm soát gen beta globin có hoạt tính ở tế bào dạng tủy (Magram *et al.*, *Nature315*:338-340 (1985); Kollias *et al.*, *Cell46*:89-94 (1986)), vùng kiểm soát gen protein nền dạng tủy có hoạt tính ở tế bào ít nhánh của não (Readhead *et al.*, *Cell48*:703-712 (1987)), vùng kiểm soát gen myosin chuỗi ngắn-2 có hoạt tính ở cơ xương (Shani, *Nature314*:283-286 (1985)), và

vùng kiểm soát gen hormon giải phóng gonadotropin có hoạt tính ở các tế bào kích thích sinh dục (gonadotroph) của vùng dưới đồi (Mason *et al.*, *Science234*:1372-1378 (1986)).

Theo phương án cụ thể, vectơ được sử dụng chứa trình tự khởi động được liên kết hoạt động với các axit nucleic mã hóa protein mong muốn, hoặc miền, mảnh, dẫn xuất hoặc thể tương đồng của chúng, một hoặc nhiều gốc tái bản, và tùy ý, một hoặc nhiều chỉ thị chọn lọc (ví dụ như, gen kháng thuốc kháng sinh). Phụ thuộc vào hệ biểu hiện, tín hiệu khởi đầu đặc hiệu cũng cần thiết cho sự dịch mã hiệu quả của trình tự PH20. Các tín hiệu này bao gồm codon khởi đầu ATG và trình tự liền kề. Trong các trường hợp trong đó codon khởi đầu và trình tự ngược dòng của PH20 hoặc dạng tan được của chúng được chèn vào vectơ biểu hiện thích hợp, thì không cần các tín hiệu kiểm soát dịch mã bổ sung nào. Trong các trường hợp trong đó chỉ có trình tự mã hóa, hoặc một phần của chúng, được chèn, thì tín hiệu kiểm soát phiên mã ngoại sinh bao gồm codon khởi đầu ATG phải được cung cấp. Ngoài ra, codon khởi đầu phải nằm trong khung đọc chính xác để đảm bảo sự phiên mã của toàn bộ đoạn chèn. Yếu tố phiên mã ngoại sinh và codon khởi đầu có thể có nguồn gốc khác nhau, cả tự nhiên và tổng hợp. Hiệu quả của sự biểu hiện có thể được tăng cường bằng cách bao gồm các trình tự tăng cường thích hợp cho hệ tế bào được sử dụng (Scharf et al. (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol,* 153:516-544).

Vectơ plasmit làm ví dụ để biến nạp các tế bào *E. coli*, bao gồm, ví dụ, vectơ biểu hiện pQE (có sẵn từ Qiagen, Valencia, CA; xem tài liệu mô tả về hệ này được công bố bởi Qiagen). Vectơ pQE có trình tự khởi động T5 thể thực khuẩn (được nhận biết bởi ARN polymeraza của *E. coli*) và môđun ức chế gen điều khiển lac dạng kép để tạo ra sự biểu hiện mức cao, được điều hòa chặt chẽ của protein tái tổ hợp ở *E. coli,* vị trí liên kết ribosom tổng hợp (RBS II) để dịch mã hiệu quả, trình tự mã hóa thẻ 6XHis, gen kết thúc phiên mã t_0 và T1, gốc tái bản ColE1, và gen beta-lactamaza để tạo ra tính kháng ampixilin. Vectơ pQE cho phép đặt thẻ 6xHis ở đầu cùng N hoặc C của protein tái tổ hợp. Các plasmit khác bao gồm pQE 32, pQE 30, và pQE 31 mà cung cấp nhiều vị trí tách dòng cho cả ba khung đọc và cung ứng cho sự biểu hiện của protein được gắn thẻ 6xHis ở đầu cùng N. Các vectơ plasmit tiêu biểu khác để biến nạp tế bào *E. coli* bao gồm, ví dụ, vectơ biểu hiện pET (xem, patent Mỹ số 4,952,496; có sẵn từ NOVAGEN, Madison, WI; xem tài liệu mô tả về hệ này được Novagen công bố). Các plasmit như vậy bao gồm pET

11a chứa trình tự khởi động T7lac, trình tự kết thúc T7, trình tự điều hòa lac cảm ứng được của *E. coli*, và gen ức chế lac; pET 12a-c chứa trình tự khởi động T7, trình tự kết thúc T7, và tín hiệu tiết ompT của *E. coli*; và pET 15b và pET19b (NOVAGEN, Madison, WI) chứa trình tự dẫn đầu His-Tag™ để sử dụng trong việc tinh chế bằng cột His và vị trí cắt thrombin cho phép phân cắt sau khi tinh chế qua cột, vùng trình tự khởi động T7-lac và trình tự kết thúc T7.

Ví dụ về vectơ để biểu hiện ở tế bào động vật có vú là vectơ biểu hiện HZ24. Vectơ biểu hiện HZ24 có nguồn gốc từ xương sống vectơ pCI (Promega). Nó chứa ADN mã hóa gen kháng Beta-lactamaza (AmpR), gốc tái bản F1, vùng trình tự tăng cường/trình tự khởi động sớm tức thì của Cytomegalovirut (CMV), và tín hiệu polyadenyl hóa muộn SV40 (SV40). Vectơ biểu hiện cũng có vị trí đi vào bên trong ribosom (IRES) từ virut ECMV (Clontech) và gen dihydrofolat reductaza của chuột nhắt (DHFR). Tế bào được chuyển nhiễm với vectơ như vậy có thể được nuôi cấy trong môi trường được xác định về mặt hóa học trong điều kiện vắng mặt hypoxantin và thymidin, sau đó là khuếch đại gen tiếp với nồng độ tăng dần của methotrexat. Các phương pháp này được mô ở đây trong các Ví dụ 13 và 15.

2. Sự biểu hiện

Polypeptit PH20, bao gồm polypeptit esPH20 và polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm các phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Protein mong muốn có thể được biểu hiện ở sinh vật bất kỳ mà thích hợp để tạo ra lượng và dạng mong muốn của protein như, ví dụ, cần cho việc dùng và điều trị. Vật chủ biểu hiện bao gồm sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn như *E. coli*, nấm men, thực vật, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, bao gồm dòng tế bào người và động vật chuyển gen. Vật chủ biểu hiện có thể khác nhau về mức tạo protein cũng như loại biến đổi sau dịch mã có mặt trên protein được biểu hiện. Việc lựa chọn vật chủ biểu hiện có thể được thực hiện dựa vào các yếu tố này và các yếu tố khác, như các điều cần xem xét về quy định và tính an toàn, chi phí sản xuất và nhu cầu và các phương pháp tinh chế.

Nhiều vectơ biểu hiện là có sẵn và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng cho sự biểu hiện của protein. Việc lựa

chọn vectơ biểu hiện sẽ bị ảnh hưởng bởi việc lựa chọn hệ biểu hiện của vật chủ. Nhìn chung, vectơ biểu hiện có thể bao gồm trình tự khởi động phiên mã và tùy ý trình tự tăng cường, tín hiệu dịch mã, và tín hiệu kết thúc phiên mã và dịch mã. Vectơ biểu hiện mà được sử dụng để biến nạp ổn định thường có chỉ thị chọn lọc mà cho phép chọn lọc và duy trì tế bào được biến nạp. Trong một số trường hợp, gốc tái bản có thể được sử dụng để khuếch đại số lượng bản sao của vectơ.

Polypeptit hyaluronidaza tan được, bao gồm esPH20, và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, cũng có thể được sử dụng hoặc được biểu hiện dưới dạng thể dung hợp protein. Ví dụ, thể dung hợp enzym có thể được tạo ra để bổ sung chức năng bổ sung vào enzym. Ví dụ về protein dung hợp enzym bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thể dung hợp của trình tự tín hiệu, thẻ như để định vị, *ví dụ* thẻ his_6 hoặc thẻ myc, hoặc thẻ để tinh chế, ví dụ, thể dung hợp GST, trình tự để điều khiển sự tiết protein và/hoặc sự kết hợp màng và các trình tự khác được sử dụng để làm tăng thời gian bán hủy như thể dung hợp Fc.

Để sản xuất lâu dài, có hiệu suất cao các protein tái tổ hợp, sự biểu hiện ổn định được mong muốn. Ví dụ, dòng tế bào mà biểu hiện ổn định PH20 tan được, như esPH20, hoặc polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, có thể được biến nạp bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện chứa gốc tái bản của virut hoặc yếu tố biểu hiện nội sinh và gen chỉ thị chọn lọc. Sau khi đưa vào vectơ, tế bào có thể được để sinh trưởng trong 1-2 ngày trong môi trường đã được làm giàu trước khi chúng được chuyển sang môi trường chọn lọc. Mục đích của chỉ thị chọn lọc là để tạo ra tính kháng với sự chọn lọc, và sự có mặt của nó cho phép sự sinh trưởng và thu hồi các tế bào mà biểu hiện thành công trình tự được đưa vào. Các tế bào có khả năng kháng trong số các tế bào được biến nạp ổn định có thể được làm tăng sinh bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thích hợp đối với các loại tế bào này.

Số lượng bất kỳ của hệ chọn lọc có thể được sử dụng để thu hồi các dòng tế bào được biến nạp. Các hệ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gen thymidin kinaza virut bộ đơn herpes (Wigler M et al. (1977) *Cell*, 11:223-32) và adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy I et al. (1980) *Cell*, 22:817-23), các gen này có thể được sử dụng trong tế bào TK hoặc APRT, một cách tương ứng. Ngoài ra, tính kháng chất kháng chuyển hóa, chất kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng làm cơ

sở để chọn lọc. Ví dụ, DHFR, mà tạo ra tính kháng methotrexat (Wigler M et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci,* 77:3567-70); npt, mà tạo ra tính kháng aminoglycosit neomyxin và G-418 (Colbere-Garapin F et al. (1981) *J. Mol. Biol.,* 150:1-14); và als hoặc pat, mà tạo ra tính kháng chlorsulfuron và phosphinotrixin axetyltransferaza, tương ứng, có thể được sử dụng. Các gen chọn lọc khác được mô tả, ví dụ, trpB, mà cho phép tế bào sử dụng indol thay vì typtophan hoặc hisD, mà cho phép tế bào sử dụng histinol thay vì histidin (Hartman SC and RC Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci,* 85:8047-51). Chỉ thị có thể nhìn thấy được, như nhưng không bị giới hạn ở, anthoxyanin, beta glucuronidaza và cơ chất của nó, GUS, và luxiferaza và cơ chất của nó luxiferin, cũng có thể được sử dụng để nhận biết các thể biến nạp và cả để định lượng lượng sự biểu hiện protein tạm thời hoặc ổn định đối với hệ vectơ cụ thể (Rhodes CA et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Sự có mặt và biểu hiện của polypeptit PH20 tan được, bao gồm esPH20, và các polypetpit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, có thể được theo dõi. Ví dụ, việc phát hiện polypeptit chức năng có thể được xác định bằng cách thử nghiệm môi trường có điều kiện cho hoạt tính enzym hyaluronidaza trong các điều kiện thích hợp. Phần G dưới đây cung cấp các thử nghiệm nêu làm ví dụ để đánh giá khả năng hòa tan và hoạt tính của protein được biểu hiện.

a. Tế bào sinh vật nhân sơ

Sinh vật nhân sơ, đặc biệt là *E. coli*, cung cấp hệ để sản xuất lượng lớn protein. Kỹ thuật biến nạp *E. coli* là kỹ thuật nhanh và đơn giản đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Vectơ biểu hiện đối với *E. coli* có thể chứa trình tự khởi động cảm ứng được, trình tự khởi động này hữu dụng để gây ra mức biểu hiện protein cao và để biểu hiện protein có độc tính nào đó đối với tế bào chủ. Ví dụ về trình tự khởi động cảm ứng được bao gồm trình tự khởi động lac, trình tự khởi động trp, trình tự khởi động lai tac, trình tự khởi động ARN T7 và SP6 và trình tự khởi động λPL được điều hòa bởi nhiệt độ.

Protein, như protein bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được biểu hiện trong môi trường tế bào chất của *E. coli*. Tế bào chất là môi trường khử và đối với một số phân tử, điều này có thể tạo thành các thể vùi không tan. Chất khử như dithiothreitol và β-mercaptoetanol và chất biến tính như guanidin-HCl và ure có thể được

sử dụng để tái hoà tan protein. Phương pháp thay thế là biểu hiện protein ở chu chất của vi khuẩn mà tạo ra môi trường oxy hoá và isomeraza giống chaperonin và isomeraza disulfit và có thể tạo ra protein tan được. Thông thường, trình tự dẫn đầu được dung hợp với protein cần biểu hiện để hướng protein tới chu chất. Đoạn dẫn đầu này sau đó được loại bỏ nhờ peptidaza tín hiệu trong chu chất. Ví dụ về trình tự dẫn đầu hướng đích tới chu chất bao gồm trình tự dẫn đầu pelB từ gen pectat lyaza và trình tự dẫn đầu có nguồn gốc từ gen phosphataza kiềm. Trong một số trường hợp, sự biểu hiện trong chu chất cho phép tiết protein được biểu hiện vào môi trường nuôi cấy. Việc tiết protein này cho phép tinh chế nhanh và đơn giản từ dịch nổi nuôi cấy. Protein không được tiết có thể thu được từ chu chất bằng cách dung giải thẩm thấu. Tương tự với việc biểu hiện trong tế bào chất, trong một số trường hợp protein có thể trở nên không tan và chất biến tính và chất khử có thể được sử dụng để thúc đẩy việc hoà tan và gấp nếp. Nhiệt độ để cảm ứng và sinh trưởng cũng có thể ảnh hưởng đến mức biểu hiện và độ tan, thông thường nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C được sử dụng. Thông thường, vi khuẩn sản xuất protein được khử glycosyl hoá. Do đó, nếu protein cần đến sự glycosyl hoá để có chức năng, sự glycosyl hoá có thể được bổ sung *in vitro* sau khi tinh chế từ tế bào chủ.

b. Tế bào nấm men

Nấm men như *Saccharomyces cerevisae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis* và *Pichia pastoris* là các vật chủ biểu hiện nấm men đã biết rõ mà có thể được sử dụng để sản xuất protein, như phương pháp bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Nấm men có thể được biến nạp với vectơ sao chép ngoại thể hoặc bằng cách kết hợp ổn định vào nhiễm sắc thể nhờ việc tái tổ hợp tương đồng. Thông thường, trình tự khởi động cảm ứng được sử dụng để điều hòa sự biểu hiện gen. Ví dụ về trình tự khởi động bao gồm trình tự khởi động GAL1, trình tự khởi động GAL7 và trình tự khởi động GAL5 và trình tự khởi động metallothionein, như CUP1, AOX1 hoặc các trình tự khởi động của *Pichia* khác hoặc các trình tự khởi động của nấm men khác. Vectơ biểu hiện thường bao gồm chỉ thị chọn lọc như LEU2, TRP1, HIS3 và URA3 để chọn lọc và duy trì ADN biến nạp. Protein được biểu hiện ở nấm men thường tan được. Việc đồng biểu hiện với chaperonin như Bip và protein isomeraza disulfua có thể cải thiện mức biểu hiện và độ tan. Ngoài ra, protein được biểu hiện ở nấm men có thể được điều khiển để tiết ra bằng cách sử dụng tín hiệu tiết phần dung hợp peptit như tín hiệu tiết yếu tố alpha

dạng ghép đôi của nấm men từ Saccharomyces cerevisae và phần dung hợp với protein bề mặt tế bào nấm men như thụ thể kết dính ghép đôi Aga2p hoặc glucoamylaza của *Arxula adeninivorans*. Vị trí cắt proteaza như đối với Kex-2 proteaza, có thể được thiết kế để loại bỏ các trình tự được dung hợp từ polypeptit được biểu hiện khi chúng đi ra khỏi quá trình tiết. Nấm men cũng có khả năng glycosyl hoá ở môtip Asn-X-Ser/Thr.

c. Tế bào côn trùng

Tế bào côn trùng, cụ thể là sử dụng hệ biểu hiện baculovirut, là hữu dụng để biểu hiện polypeptit như polypeptit hyaluronidaza. Tế bào côn trùng biểu hiện mức cao của protein và có khả năng thực hiện hầu hết các cải biến sau dịch mã được sử dụng bởi sinh vật nhân chuẩn bậc cao. Baculovirut có phổ ký chủ giới hạn mà cải thiện tính an toàn và làm giảm mối quan ngại về quy định của sự biểu hiện ở sinh vật nhân chuẩn. Vectơ biểu hiện tiêu biểu sử dụng trình tự khởi động để biểu hiện mức cao, như trình tự khởi động polyhedrin của baculovirut. Hệ baculovirut được sử dụng phổ biến bao gồm các baculovirut như virut đa diện nhân của *Autographa californica* (AcNPV), và virut đa diện nhân của *Bombyx mori* (BmNPV) và dòng tế bào côn trùng như Sf9 có nguồn gốc từ *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) và *Danaus plexippus* (DpN1). Để biểu hiện mức cao, trình tự nucleotit của phân tử cần biểu hiện được dung hợp ngay sau codon khởi động polyhedrin của virut. Tín hiệu tiết của động vật có vú được xử lý chính xác trong các tế bào côn trùng và có thể được sử dụng để tiết protein được biểu hiện vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, dòng tế bào *Pseudaletia unipuncta* (A7S) và *Danaus plexippus* (DpN1) tạo ra protein bằng cách thức glycosyl hoá tương tự với hệ tế bào động vật có vú. Tế bào côn trùng nêu làm ví dụ là tế bào côn trùng được thay đổi để làm giảm khả năng sinh miễn dịch, bao gồm tế bào côn trùng với vectơ biểu hiện baculovirut "được động vật có vú hóa" và tế bào côn trùng thiếu enzym FT3.

Hệ biểu hiện thay thế ở tế bào côn trùng là sử dụng tế bào biến nạp ổn định. Dòng tế bào như tế bào Schneider 2 (S2) và tế bào Kc (*Drosophila melanogaster*) và tế bào C7 (*Aedes albopictus*) có thể được sử dụng để biểu hiện. Trình tự khởi động *Drosophila* metallothionein có thể được sử dụng để gây ra mức biểu hiện cao khi có sự cảm ứng bằng kim loại nặng với cadimi hoặc đồng. Vectơ biểu hiện thường được duy trì nhờ việc sử dụng các chỉ thị chọn lọc như neomyxin và hygromyxin.

d. Tế bào của động vật có vú

Hệ biểu hiện động vật có vú có thể được sử dụng để biểu hiện protein bao gồm polypeptit hyaluronidaza tan được. Cấu trúc biểu hiện có thể được chuyển vào tế bào động vật có vú bằng cách gây nhiễm virut như adenovirut hoặc bằng cách chuyển ADN trực tiếp như liposom, canxi phosphat, DEAE-dextran và bằng các phương pháp vật lý như xung điện và vi tiêm. Vectơ biểu hiện cho tế bào động vật có vú thường bao gồm vị trí mũ mARN, hộp TATA, trình tự khởi động dịch mã (trình tựliên ứng Kozak) và các yếu tố polyadenyl hóa. Các yếu tố IRES cũng có thể được bổ sung để cho phép biểu hiện hai xitron với gen khác, như chỉ thị chọn lọc. Các vectơ này thường bao gồm trình tự khởi động-trình tự tăng cường phiên mã để biểu hiện mức cao, ví dụ như trình tự khởi động-trình tự tăng cường SV40, trình tự khởi động cytomegalovirut (CMV) của người và đoạn lặp đầu cùng dài của virut saccôm Rous (RSV). Các trình tự khởi động-trình tự tăng cường này có hoạt tính ở nhiều loại tế bào. Trình tự khởi động dạng mô và dạng tế bào và vùng trình tự tăng cường cũng có thể được sử dụng để biểu hiện. Vùng trình tự khởi động/trình tự tăng cường tiêu biểu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vùng trình tự khởi động/trình tự tăng cường từ gen như elastaza I, insulin, globulin miễn dịch, virut gây u tuyến vú ở chuột nhắt, albumin, alpha fetoprotein, alpha 1 kháng trypsin, beta globin, protein nền myelin, chuỗi nhẹ myosin 2, và gen kiểm soát hormon giải phóng gonadotropin. Chỉ thị chọn lọc có thể được sử dụng để chọn lọc và duy trì các tế bào có cấu trúc biểu hiện. Ví dụ về các gen chỉ thị chọn lọc bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hygromyxin B phosphotransferaza, adenosin deaminaza, xanthin-guanin phosphoribosyl transferaza, aminoglycosit phosphotransferaza, dihydrofolat reductaza (DHFR) và thymidin kinaza. Ví dụ, việc biểu hiện có thể được thực hiện trong điều kiện có mặt metotrexat để chỉ chọn các tế bào biểu hiện gen DHFR. Việc dung hợp với phân tử truyền tín hiệu bề mặt tế bào như TCR-ζ và $Fc_εRI$-γ có thể điều khiển sự biểu hiện của protein ở trạng thái hoạt tính trên bề mặt tế bào.

Nhiều dòng tế bào là có sẵn để biểu hiện ở động vật có vú bao gồm tế bào chuột nhắt, chuột cống, người, khỉ, gà và chuột đồng. Các dòng tế bào tiêu biểu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 của chuột nhắt (không tiết) và các dòng tế bào u tuỷ khác, dòng tế bào lai và dòng tế bào lai khác loại, lympho bào, nguyên bào sợi, các tế bào Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, và HKB. Dòng tế bào cũng sẵn thích nghi với môi trường không chứa huyết thanh mà thúc đẩy việc tinh

chế protein được tiết từ môi trường nuôi cấy tế bào. Ví dụ bao gồm các tế bào CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) và dòng tế bào EBNA-1 không chứa huyết thanh (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng. 84*:332-42.). Dòng tế bào cũng có sẵn mà thích nghi để sinh trưởng trong môi trường đặc biệt được tối ưu hoá để biểu hiện tối đa. Ví dụ, các tế bào DG44 CHO thích nghi để sinh trưởng trong dịch cấy huyền phù trong môi trường xác định về mặt hoá học, không chứa sản phẩm động vật.

e. Thực vật

Các tế bào thực vật chuyển gen và thực vật chuyển gen có thể được sử dụng để biểu hiện protein, như phương pháp bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Cấu trúc biểu hiện thường được chuyển vào thực vật bằng cách chuyển ADN trực tiếp như phương pháp bắn phá vi đạn và phương pháp chuyển qua trung gian PEG vào thể nguyên sinh, và bằng cách biến nạp qua trung gian agrobacterium. Vectơ biểu hiện có thể bao gồm trình tự khởi động và trình tự tăng cường, yếu tố kết thúc phiên mã và yếu tố kiểm soát dịch mã. Vectơ biểu hiện và các kỹ thuật biến nạp thường được phân chia giữa vật chủ thực vật hai lá mầm, như *Arabidopsis* và thuốc lá, và vật chủ thực vật một lá mầm, như ngô và lúa. Ví dụ về trình tự khởi động thực vật được sử dụng để biểu hiện bao gồm trình tự khởi động của virut gây bệnh khảm ở cây hoa lơ, trình tự khởi động nopalin syntaza, trình tự khởi động riboza bisphosphat carboxylaza và trình tự khởi động ubiquitin và UBQ3. Chỉ thị chọn lọc như hygromyxin, phosphomannoza isomeraza và neomyxin phosphotransferaza thường được sử dụng để thúc đẩy việc chọn lọc và duy trìcác tế bào biến nạp. Các tế bào thực vật biến nạp có thể được duy trì trong dịch cấy dưới dạng các tế bào, các khối tụ (mô sẹo) hoặc được tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Các tế bào thực vật chuyển gen cũng có thể bao gồm tảo được thiết kế để sản xuất polypeptit hyaluronidaza. Do thực vật có nhiều cách thức glycosyl hoá khác nhau với tế bào động vật có vú, nên điều này có thể ảnh hưởng đến việc lựa chọn protein được tạo ra từ các vật chủ này.

3. Các kỹ thuật tinh chế

Tế bào chủ được biến nạp với trình tự axit nucleic mã hóa PH20 tan được, bao gồm esPH20, và các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, có thể được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện và thu hồi protein được mã hóa từ dịch nuôi cấy tế bào. Protein được sản xuất bởi tế bào tái tổ hợp thường được tiết, nhưng có thể được chứa một cách nội bào phụ thuộc vào trình tự và/hoặc vectơ được sử dụng. Sẽ

được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật là, vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa PH20 có thể được thiết kế với trình tự tín hiệu mà thúc đẩy sự tiết trực tiếp của PH20 qua màng tế bào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn.

Như vậy, phương pháp tinh chế polypeptit từ tế bào chủ sẽ phụ thuộc vào các tế bào chủ và hệ biểu hiện được lựa chọn. Đối với các phân tử được tiết ra, protein thường được tinh chế từ môi trường nuôi cấy sau khi loại bỏ các tế bào. Để biểu hiện nội bào, các tế bào có thể được dung giải và protein được tinh chế từ dịch chiết. Khi sinh vật chuyển gen như thực vật và động vật chuyển gen được sử dụng để biểu hiện, các mô hoặc cơ quan có thể được sử dụng làm vật liệu bắt đầu để tạo ra dịch chiết tế bào được dung giải. Ngoài ra, việc sản xuất động vật chuyển gen có thể bao gồm việc sản xuất polypeptit trong sữa hoặc trứng, mà có thể được thu lại, và nếu cần, protein có thể được chiết và tiếp tục được tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn trong tình trạng kỹ thuật.

Protein, như polypeptit PH20 tan được, bao gồm polypeptit esPH20, hoặc các polypeptit PH20 được cắt cụt ở đầu cùng C khác, có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, SDS-PAGE, sắc ký phân mảnh theo cỡ và loại cỡ, kết tủa amoni sulfat và sắc ký trao đổi ion, như trao đổi anion. Các kỹ thuật tinh chế ái lực cũng có thể được sử dụng để cải thiện hiệu quả và độ tinh khiết của chế phẩm. Ví dụ, kháng thể, thụ thể và các phân tử khác mà liên kết enzym hyaluronidaza có thể được sử dụng trong phương pháp tinh chế ái lực.

Cấu trúc biểu hiện cũng có thể được thiết kế để bổ sung thẻ ái lực vào protein như myc epitop, thể dung hợp GST hoặc His_6 và được tinh chế ái lực bằng kháng thể myc, lần lượt là nhựa glutathion và nhựa Ni. Các thẻ này có thể được nối với trình tự nucleotit mã hóa PH20 tan được như được nêu là các phần khác trong bản mô tả này, mà có thể thúc đẩy việc tinh chế các protein tan được. Ví dụ, PH20 tan được có thể được biểu hiện dưới dạng protein tái tổ hợp với một hoặc nhiều miền polypeptit bổ sung được bổ sung để thúc đẩy việc tinh chế protein. Các miền thúc đẩy việc tinh chế như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, peptit tạo chelat kim loại như môđun histidin-tryptophan mà cho phép tinh chế trên kim loại cố định, miền protein A mà cho phép tinh chế trên globulin miễn dịch cố định và miền được sử dụng trong hệ tinh chế ái lực/kéo dài FLAGS

(Immunex Corp., Seattle Wash.). Việc bao gồm trình tự cầu nối phân cắt được như Yếu tố XA hoặc enterokinaza (Invitrogen, San Diego, CA) giữa miền tinh chế và polypeptit PH20 được biểu hiện là hữu ích để thúc đẩy việc tinh chế. Một vectơ biểu hiện như vậy được cung cấp để biểu hiện protein dung hợp chứa PH20 tan được và chứa axit nucleic mã hóa 6 gốc histidin sau đó là thioredoxin và vị trí cắt enterokinaza. Các gốc histidin thúc đẩy việc tinh chế trên IMIAC (sắc ký ái lực ion kim loại cố định), trong khi vị trí cắt enterokinaza cung cấp biện pháp để tinh chế polypeptit từ protein dung hợp.

Độ tinh khiết có thể được đánh giá bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bao gồm kỹ thuật điện di gel, phương pháp HPLC trực giao, kỹ thuật nhuộm và đo quang phổ. Protein được biểu hiện và được tinh chế có thể được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm hoặc phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, thử nghiệm hoặc phương pháp bất kỳ được mô tả trong Phần G. Các thử nghiệm và phương pháp này bao gồm thử nghiệm dựa trên các tính chất vật lý và/hoặc chức năng của protein, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phân tích bằng điện di gel, thử nghiệm miễn dịch và thử nghiệm về hoạt tính hyaluronidaza.

Tùy thuộc vào hệ biểu hiện và tế bào chủ được sử dụng, polypeptit thu được có thể không đồng nhất do peptidaza có mặt trong môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất và tinh chế. Ví dụ, việc nuôi cấy PH20 tan được trong tế bào CHO có thể tạo ra hỗn hợp của các polypeptit không đồng nhất. Quy trình nêu làm ví dụ để sản sinh, sản xuất và tinh chế PH20 tan được (ví dụ rHuPH20) được mô tả trong Ví dụ 13-15 dưới đây. Tương tự, ví dụ, sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự axit amin 36-497 được nêu trong SEQ ID NO:60, có thể tạo ra hỗn hợp không đồng nhất của các polypeptit khác nhau bao gồm polypeptit mà kết thúc ở 497, 496, 495, 494, 493, 492, 491, 490, 489 hoặc ngắn hơn.

F. Điều chế, bào chế và sử dụng polypeptit PH20 kéo dài tan được, và các polypeptit PH20 tan được khác

Dược phẩm chứa polypeptit PH20 tan được, bao gồm esPH20, được đề xuất trong bản mô tả này để sử dụng. Polypeptit PH20 tan được có thể được bào chế một cách riêng rẽ, hoặc có thể được đồng tạo chế phẩm hoặc được đồng sử dụng với dược phẩm chứa các chất trị liệu khác, ví dụ, như được nêu trong phần G. Hợp chất có thể được bào chế thành chế phẩm dược thích hợp như dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên nén phân tán

được, viên tròn, viên nang, dạng bột, chế phẩm hoặc cồn ngọt giải phóng kéo dài, để sử dụng qua đường miệng, cũng như chế phẩm cao dán qua da và ống hít bột khô. Thông thường, hợp chất được bào chế thành dược phẩm sử dụng các kỹ thuật và quy trình đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ, Ansel *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Tái bản lần thứ 4, 1985, 126).

Thông thường, liều có hiệu quả điều trị được bao gồm. Lượng PH20 tan được được chọn cần được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh có thể được xác định bởi các kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm *in vitro* và mô hình thử nghiệm ở động vật có thể được sử dụng để trợ giúp việc xác định khoảng liều tối ưu. Liều chính xác, mà có thể được xác định theo kinh nghiệm, có thể phụ thuộc vào enzym cụ thể, đường dùng, loại bệnh cần được điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Do đó, cần phải hiểu rằng liều lượng chính xác và thời gian điều trị là hàm số của bệnh được điều trị và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các quy trình thử nghiệm đã biết hoặc bằng cách ngoại suy từ số liệu thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro*. Cần phải lưu ý rằng các nồng độ và giá trị liều cũng có thể thay đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh cần được làm thuyên giảm. Cũng cần phải hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, phác đồ liều cụ thể phải được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu của cá nhân và sự đánh giá chuyên nghiệp của người quản lý hoặc giám sát việc sử dụng chế phẩm, và khoảng nồng độ được nêu trong bản mô tả này chỉ có tính chất làm ví dụ và không được dự định là làm giới hạn phạm vi hoặc giới hạn việc sử dụng chế phẩm và hỗn hợp chứa chúng. Chế phẩm có thể được sử dụng hàng giờ, hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng, hàng năm hoặc chỉ một lần. Thông thường, phác đồ liều được chọn để hạn chế độc tính. Cần lưu ý rằng bác sĩ chăm sóc sẽ biết cách và thời điểm để kết thúc, ngừng hoặc điều chỉnh sự trị liệu xuống mức liều thấp hơn do độc tính, hoặc sự loạn chức năng tủy xương, gan hoặc thận hoặc các mô khác. Ngược lại, bác sĩ chăm sóc cũng sẽ biết cách và thời điểm để điều chỉnh sự điều trị đến mức cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không đầy đủ (ngăn ngừa các tác dụng phụ độc).

Chế phẩm dược dụng được điều chế trên quan điểm sự chấp thuận đối với cơ quan điều hành hoặc cơ quan khác được điều chế theo điển dược được công nhận một cách phổ biến để sử dụng ở động vật và người. Chế phẩm có thể ở dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, dạng bột, và chế phẩm giải phóng kéo dài. Chế

phẩm có thể được bào chế dưới dạng thuốc đạn, với các chất liên kết và chất mang truyền thống như triglyxerit. Chế phẩm dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang chuẩn như loại dùng trong dược phẩm của manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, và các chất tương tự khác. Chế phẩm phải phù hợp với cách thức sử dụng.

Dược phẩm có thể bao gồm chất mang như chất pha loãng, chất bổ trợ, tá dược, hoặc tá dược lỏng mà PH20 tan được được dùng với chúng. Ví dụ về chất mang dược dụng thích hợp được nêu trong tài liệu "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E. W. Martin. Các chế phẩm này sẽ chứa lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất, thường là ở dạng tinh khiết, cùng với lượng thích hợp của chất mang để tạo ra dạng để sử dụng thích hợp cho bệnh nhân. Các chất mang dược dụng này có thể là chất lỏng vô trùng như nước và dầu, bao gồm dầu mỏ, dầu có nguồn gốc từ động vật, thực vật hoặc dầu tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, và dầu vừng. Nước là chất mang điển hình khi dược phẩm được dùng trong tĩnh mạch. Dung dịch nước muối và dung dịch dextroza và glyxerol có nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể là cho dung dịch tiêm được. Các chế phẩm có thể chứa cùng với thành phần hoạt tính: chất pha loãng như lactoza, sucroza, dicanxi phosphat, hoặc carboxymetylxelluloza; chất bôi trơn như magie stearat, canxi stearat và đá tal; và chất liên kết như tinh bột, gôm tự nhiên như gôm acaciagelatin, glucoza, rỉ đường, polyvinylpyrolidin, xenluloza và dẫn xuất của chúng, povidon, crospovidon và các chất liên kết tương tự khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cáctá dược dược dụng thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột, đá phấn, silic dioxitgel, natri stearat, glyxerol monostearat, đá tal, natri clorua, sữa tách kem khô, glyxerol, propylen, glycol, nước, và etanol. Chế phẩm, nếu muốn, cũng có thể chứa lượng nhỏ chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH, ví dụ, axetat, natri xitrat, dẫn xuất xyclodextrin, sorbitan monolaurat, trietanolamin natri axetat, trietanolamin oleat, và các chất tương tự khác.

Chế phẩm chứa các hợp chất có hoạt tính trị liệu về mặt dược lý và dẫn xuất của chúng được đề xuất để sử dụng cho người và động vật ở dạng liều đơn vị hoặc dạng đa liều. Ví dụ, hợp chất có thể được bào chế dưới dạng viên nén, viên nang, viên tròn, dạng bột, hạt, dung dịch hoặc hỗn dịch vô trùng dùng ngoài đường tiêu hóa, và dung dịch hoặc

hỗn dịch dùng qua đường miệng, và nhũ tương dầu nước chứa lượng thích hợp của chất hợp hoặc dẫn xuất dược dụng của chúng. Mỗi liều đơn vị chứa lượng được xác định trước của hợp chất có hoạt tính trị liệu đủ để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn, kết hợp với chất mang, tá dược lỏng hoặc chất pha loãng dược dụng cần thiết. Ví dụ về dạng liều đơn vị bao gồm ống thuốc tiêm và ống tiêm và viên nén hoặc viên nang được đóng gói riêng rẽ. Dạng liều đơn vị có thể được dùng dưới dạng các phân mảnh hoặc nhiều liều đơn vị của chúng. Dạng đa liều là nhiều dạng liều đơn vị giống nhau được đóng gói trong một vật chứa để được dùng dưới dạng liều đơn vị tách biệt. Ví dụ về dạng đa liều bao gồm lọ nhỏ, chai chứa các viên nén hoặc viên nang hoặc chai dung tích tính bằng panh hoặc galon. Do đó, dạng đa liều là nhiều liều đơn vị mà không bị tách biệt khi đóng gói. Thông thường, có thể tạo ra dạng liều hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính nằm trong khoảng từ 0,005% đến 100% với phần còn lại được điều chế từ chất mang không độc.

Chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này thường được bào chế để dùng qua đường dưới da, mặc dù các đường dùng khác cũng được đề xuất, như đường dùng bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm tiêm trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, trong da, trong thương tổn, trong màng bụng, dùng ngoài màng cứng, qua đường âm đạo, qua đường trực tràng, cục bộ, tại chỗ, qua tai, qua da hoặc đường dùng bất kỳ. Các chế phẩm phù hợp với các đường dùng như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc dùng có thể là tại chỗ, cục bộ hoặc toàn thân tuỳ thuộc vào vị trí điều trị. Việc dùng tại chỗ cho vùng cần điều trị có thể đạt được bằng cách, ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở, truyền tại chỗ trong khi phẫu thuật, sử dụng cục bộ, ví dụ như kết hợp với miếng băng vết thương sau khi phẫu thuật, bằng cách tiêm, bằng ống thông tiểu, bằng thuốc đạn, hoặc bằng mô cấy. Các chế phẩm cũng có thể được dùng với các chất có hoạt tính sinh học khác, liên tục, gián đoạn hoặc trong cùng chế phẩm.

Đường dùng thích hợp nhất trong các trường hợp bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, như bản chất của bệnh, sự tiến triển của bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh, chế phẩm cụ thể được sử dụng. Thông thường, chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này được dùng ngoài đường tiêu hóa. Trong một số ví dụ, chế phẩm PH20 tan được được dùng sao cho chúng vào tới kẽ da hoặc mô, nhờ đó phân giải khoang kẽ để sau đó dẫn truyền chất trị liệu. Do đó, trong một số ví dụ, việc dùng trực tiếp dưới da, như bằng

các phương pháp dùng dưới da, được đề xuất. Do đó, trong một ví dụ, việc dùng tại chỗ có thể có thể đạt được bằng cách tiêm, như từ ống tiêm hoặc sản phẩm của quá trình sản xuất chứa dụng cụ tiêm khác như kim tiêm. Trong ví dụ khác, việc dùng tại chỗ có thể đạt được bằng cách truyền, mà có thể được thúc đẩy bằng việc sử dụng bơm hoặc dụng cụ tương tự khác. Các cách dùng khác cũng được đề xuất. Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng liều thích hợp cho mỗi đường dùng.

Các phương pháp dùng có thể được sử dụng để làm giảm sự tiếp xúc của các hợp chất được chọn với các quá trình phân giải, như sự phân giải theo cách phân giải protein và sự can thiệp miễn dịch thông qua các đáp ứng kháng nguyên và đáp ứng miễn dịch. Ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm việc dùng tại chỗ tại vị trí điều trị. Việc pegyl hoá các chất trị liệu được ghi nhận là làm tăng tính kháng sự phân giải protein, làm tăng thời gian bán huỷ trong huyết tương, và làm giảm tính kháng nguyên và khả năng sinh miễn dịch. Ví dụ về các phương pháp pegyl hoá là đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Lu and Felix, *Int. J. Peptide Protein Res., 43*: 127-138, 1994; Lu and Felix, *Peptide Res., 6:* 142-6, 1993; Felix *et al.*, *Int. J. Peptide Res., 46* : 253-64, 1995; Benhar *et al.*, *J. Biol. Chem., 269*: 13398-404, 1994; Brumeanu *et al.*, *J Immunol., 154*: 3088-95, 1995; xem thêm, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10)*:1261-77 và Molineux (2003) *Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2)*:3S-8S). Bước pegyl hoá cũng có thể được sử dụng trong việc dẫn truyền phân tử axit nucleic *in vivo*. Ví dụ, việc pegyl hoá adenovirut có thể làm tăng độ ổn định và sự chuyển gen (xem, ví dụ, Cheng *et al.* (2003) *Pharm. Res.20(9)*: 1444-51).

1. Các chất tiêm được, dung dịch và nhũ tương

Việc dùng ngoài đường tiêu hóa, thường được đặc trưng bởi việc tiêm hoặc truyền dưới da, trong màng nhầy, trong tĩnh mạch hoặc trong da được bao hàm trong bản mô tả này. Các chất tiêm được có thể được điều chế ở dạng thông dụng, hoặc dưới dạng dung dịch lỏng hoặc huyền phù, dạng rắn thích hợp để hoà tan hoặc tạo huyền phù trong chất lỏng trước khi tiêm, hoặc dưới dạng nhũ tương. Tá dược thích hợp là, ví dụ, nước, nước muối, dextroza, glyxerol hoặc etanol. Dược phẩm có thể chứa lượng nhỏ khác của chất bổ trợ không độc như chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất ổn định, trình tự tăng cường độ tan, và các chất tương tự khác, như, ví dụ, natri axetat, sorbitan monolaurat, trietanolamin oleat và xyclodextrin. Việc cấy hệ giải phóng chậm hoặc hệ

giải phóng duy trì liên tục, sao cho mức liều ổn định được duy trì (xem, ví dụ, patent Mỹ số 3,710,795) cũng được đề xuất trong bản mô tả này. Tỷ lệ phần trăm của hoạt chất được chứa trong các chế phẩm này phụ thuộc nhiều vào bản chất cụ thể của chúng, cũng như hoạt tính của hợp chất và nhu cầu của đối tượng.

Các chất tiêm được được thiết kế để dùng tại chỗ hoặc toàn thân. Đối với các mục đích trong bản mô tả này, việc dùng tại chỗ được mong muốn để dùng trực tiếp cho kẽ bị tác động. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch vô trùng sẵn sàng để tiêm, sản phẩm khô vô trùng tan được như bột đông khô sẵn sàng để kết hợp với dung môi ngay trước khi sử dụng, bao gồm viên nén dùng dưới da, huyền phù vô trùng sẵn sàng để tiêm, sản phẩm khô vô trùng không tan được sẵn sàng để kết hợp với tá dược lỏng ngay trước khi sử dụng và nhũ tương vô trùng. Dung dịch có thể là có nước hoặc không có nước. Nếu được dùng trong tĩnh mạch, chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý hoặc nước muối đệm phosphat (PBS), và dung dịch chứa chất làm đặc và chất làm tan, như glucoza, polyetylen glycol, và polypropylen glycol và hỗn hợp của chúng.

Chất mang dược dụng được sử dụng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tá dược lỏng có nước, tá dược lỏngkhông có nước, chất kháng vi sinh vật, chất đẳng trương, chất đệm, chất chống oxy hóa, chất gây tê tại chỗ, chất tạo huyền phù và phân tán, chất nhũ hóa, chất càng hoá hoặc chelat hoá và các chất dược dụng khác.

Ví dụ về tá dược lỏng có nước bao gồm dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringers, dung dịch tiêm dextroza đẳng trương, dung dịch tiêm nước vô trùng, dung dịch tiêm dextroza và Ringers được lactat hoá. Tá dược lỏng không chứa nước để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dầu không bay hơi có nguồn gốc thực vật, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng và dầu lạc. Chất kháng vi sinh vật ở nồng độ ức chế vi khuẩn hoặc ức chế nấm có thể được bổ sung vào chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa được đóng gói trong vật chứa đa liều, bao gồm phenol hoặc cresol, mercurial, rượu benzyl, clobutanol, metyl và este của axit propyl p-hydroxybenzoic, thimerosal, benzalkoni clorua và benzethoni clorua. Chất đẳng trương bao gồm natri clorua và dextroza. Chất đệm bao gồm phosphat và xitrat. Chất chống oxy hóa bao gồm natri bisulfat. Chất gáy tê tại chỗ bao gồm procain hydroclorua. Chất tạo huyền phù và làm phân tán bao gồm natri carboxymetylxenluloza, hydroxypropyl metylxelluloza và polyvinylpyrolidon. Chất nhũ

hóa bao gồm Polysorbat 80 (TWEEN 80). Chất càng hoá hoặc chelat hóa ion kim loại bao gồm EDTA. Chất mang dược dụng cũng bao gồm rượu etyl, polyetylen glycol và propylen glycol cho tá dược lỏng có thể trộn lẫn với nước và natri hydroxit, axit clohydric, axit xitric hoặc axit lactic để điều chỉnh độ pH.

Nồng độ của hợp chất có dược tính được điều chỉnh để việc tiêm hoặc truyền cung cấp lượng hữu hiệu để tạo ra tác dụng dược lý mong muốn. Liều chính xác phụ thuộc vào độ tuổi, cân nặng và tình trạng bệnh của bệnh nhân hoặc động vật như đã biết trong lĩnh vực. Chế phẩm liều đơn vị dùng ngoài đường tiêu hóa được đóng gói trong ống thuốc tiêm, lọ nhỏ hoặc ống tiêm với kim. Thể tích của dung dịch lỏng hoặc chế phẩm bột được hoàn nguyên, chứa hợp chất có dược tính, phụ thuộc vào của bệnh cần điều trị và sản phẩm của quá trình sản xuất cụ thể được chọn để đóng gói. Tất cả các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa phải là vô trùng, như đã biết và được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong một ví dụ, dược phẩm có thể là ở dạng lỏng, ví dụ như dung dịch, xi rô hoặc huyền phù. Nếu được tạo ra ở dạng lỏng, các dược phẩm có thể được tạo ra dưới dạng chế phẩm đặc để được pha loãng đến nồng độ có hiệu quả trị liệu trước khi sử dụng. Các chế phẩm lỏng như vậy có thể được điều chế bằng các cách thông dụng với các chất phụ gia dược dụng như chất tạo huyền phù (ví dụ như xi rô sorbitol, dẫn xuất xenluloza hoặc chất béo ăn được được hydro hoá); chất nhũ hóa (ví dụ như lexithin hoặc acacia); tá dược lỏng không có nước (ví dụ như dầu quả hạnh, este dầu, hoặc dầu thực vật được cất phân đoạn); và chất bảo quản (ví dụ như metyl hoặc propyl-p-hydroxybenzoat hoặc axit sorbic). Trong ví dụ khác, các dược phẩm có thể được trình bày ở dạng đông khô để hoàn nguyên bằng nước hoặc các tá dược lỏng thích hợp khác trước khi sử dụng.

Bột đông khô

Được đề xuất trong bản mô tả này là bột đông khô mà có thể được hoàn nguyên để dùng dưới dạng dung dịch, nhũ tương và các hỗn hợp khác. Chúng cũng có thể được hoàn nguyên và được bào chế dưới dạng chất rắn hoặc gel.

Bột đông khô tiệt trùng được điều chế bằng cách hòa tan hợp chất của enzym bất hoạt trong dung dịch đệm. Dung dịch đệm này có thể chứa tá dược mà cải thiện độ ổn định hoặc các thành phần có dược lý khác của bột hoặc dung dịch được hoàn nguyên,

được điều chế từ bột. Việc lọc vô trùng sau đó của dung dịch được theo sau bởi việc làm đông khô trong các điều kiện tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tạo ra chế phẩm mong muốn. Một cách tóm tắt, bột đông khô được điều chế bằng cách hòa tan tá dược như dextroza, sorbital, fructoza, xi rô ngô, xylitol, glyxerin, glucoza, sucroza hoặc chất thích hợp khác, trong đệm thích hợp như xitrat, natri hoặc kali phosphat hoặc đệm tương tự khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Sau đó, enzym được chọn được bổ sung vào hỗn hợp tạo thành, và được khuấy đến khi nó hoà tan. Hỗn hợp tạo thành được lọc vô trùng hoặc được xử lý để loại bỏ các hạt và để đảm bảo sự vô trùng, và được chia thành từng phần vào các lọ nhỏ để làm đông khô. Mỗi lọ nhỏ sẽ chứa một liều đơn hoặc nhiều liều của hợp chất. Bột đông khô có thể được bảo quản trong điều kiện thích hợp, như ở khoảng 4°C đến nhiệt độ phòng. Việc hoàn nguyên bột đông khô này bằng dung dịch đệm tạo ra chế phẩm để sử dụng trong việc dùng ngoài đường tiêu hóa.

2. Sử dụng tại chỗ

Hỗn hợp dùng tại chỗ được điều chế như được mô tả cho việc sử dụng cục bộ và hệ thống. Hỗn hợp thu được có thể là dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương hoặc các dạng tương tự và được bào chế dưới dạng kem, gel, thuốc mỡ, nhũ tương, dung dịch, cồn ngọt, thuốc lỏng, hỗn dịch, cồn thuốc, thuốc nhão, bọt, sol khí, chế phẩm để tưới, chế phẩm phun, thuốc đạn, băng, miếng dán da hoặc chế phẩm bất kỳ khác thích hợp để dùng tại chỗ.

Hợp chất hoặc dẫn xuất dược dụng của chúng có thể được bào chế dưới dạng sol khí để dùng tại chỗ, như bằng cách xông hít (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,044,126,4,414,209, và 4,364,923, mô tả sol khí để phân phối steroit hữu ích để điều trị bệnh viêm, đặc biệt là bệnh hen). Các chế phẩm để sử dụng cho đường hô hấp này có thể ở dạng sol khí hoặc dung dịch cho ống phun, hoặc dưới dạng bột vi mịn để bơm, một mình hoặc cùng với chất mang trơ như lactoza. Trong trường hợp này, các hạt của chế phẩm thường sẽ có đường kính nhỏ hơn 50 micromet, hoặc nhỏ hơn 10 micromet.

Hợp chất có thể được bào chế để dùng cục bộ hoặc tại chỗ, như để sử dụng tại chỗ cho da và màng nhầy, như trong mắt, dưới dạng gel, kem, và thuốc lỏng và để sử dụng cho mắt hoặc trong bể lớn hoặc sử dụng trong tủy sống. Việc sử dụng tại chỗ được dự tính để phân phối qua da và cũng để sử dụng cho mắt hoặc màng nhầy, hoặc cho các trị

liệu dạng xông hít. Dung dịch dùng qua mũi của hoạt chất một mình hoặc cùng với các tá dược dược dụng khác cũng có thể được sử dụng.

Chế phẩm thích hợp để dùng qua da được đề xuất. Chúng có thể được cung cấp ở dạng thích hợp bất kỳ, như các miếng dán riêng biệt được làm thích ứng để vẫn tiếp xúc tốt với biểu bì của người nhận trong khoảng thời gian dài. Các miếng dán này chứa hoạt chất trong dung dịch gốc nước được đệm tùy ý có, ví dụ, nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2 M đối với hoạt chất. Chế phẩm thích hợp để dùng qua da cũng có thể được phân phối bằng phương pháp điện chuyển ion (xem, ví dụ, *Pharmaceutical Research* 3(6):318 (1986)) và thường ở dạng dung dịch gốc nước được đệm tùy ý của hoạt chất.

3.Chế phẩm để dùng qua các đường dùng khác

Tùy thuộc vào tình trạng bệnh cần được điều trị, các đường dùng khác, như sử dụng tại chỗ, miếng dán qua da, dùng qua đường miệng và qua trực tràng cũng được bao gồm trong bản mô tả này. Ví dụ, dạng liều dược lý để dùng qua trực tràng là thuốc đạn dùng qua trực tràng, viên nang và viên nén để tác động toàn thân. Thuốc đạn dùng qua trực tràng bao gồm thể rắn để cho vào trực tràng mà sẽ tan chảy hoặc mềm ra ở nhiệt độ cơ thể giải phóng một hoặc nhiều thành phần hoạt tính dược lý hoặc trị liệu. Hợp chất dược dụng được sử dụng trong thuốc đạn dùng qua trực tràng là bazơ hoặc tá dược lỏng và chất để làm tăng nhiệt độ nóng chảy. Ví dụ về bazơ bao gồm mỡ thực vật lấy từ cacao (dầu theobroma), glyxerin-gelatin, carbowax (polyoxyetylen glycol) và hỗn hợp thích hợp của mono-, di- và triglyxerit của axit béo. Hỗn hợp của các bazơ khác nhau có thể được sử dụng. Chất để làm tăng nhiệt độ nóng chảy của thuốc đạn bao gồm spermaceti (sáp cá nhà táng) và sáp. Thuốc đạn dùng qua trực tràng có thể được điều chế bằng phương pháp nén hoặc bằng cách tạo khuôn. Khối lượng tiêu biểu của thuốc đạn dùng qua trực tràng nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 3 gam. Viên nén và viên nang để dùng qua trực tràng được sản xuất bằng cách sử dụng chất dược dụng và các phương pháp giống như cho chế phẩm để sử dụng qua đường miệng.

Chế phẩm thích hợp để dùng qua trực tràng có thể được cung cấp dưới dạng thuốc đạn liều đơn vị. Các chế phẩm này có thể được điều chế bằng cách trộn lẫn hoạt chất với một hoặc nhiều chất mang rắn thông thường, ví dụ, mỡ thực vật lấy từ cacao, và sau đó tạo hình dạng hỗn hợp thu được.

Để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm có thể ở dạng, ví dụ, viên nén hoặc viên nang được điều chế bằng các phương pháp thông thường với tá dược dược dụng như chất liên kết (*ví dụ*, tinh bột ngô được gelatin hóa sơ bộ, polyvinyl pyrolidon hoặc hydroxypropyl metylxenluloza); chất độn (*ví dụ*, lactoza, xenluloza dạng vi tinh thể hoặc canxi hydro phosphat); chất làm trơn (*ví dụ*, magie stearat, đá tal hoặc silic dioxit); chất phân hủy (*ví dụ*, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat); hoặc chất thấm ướt (*ví dụ*, natri lauryl sulphat). Viên nén có thể được bao bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm thích hợp để dùng trong má (dưới lưỡi) bao gồm, ví dụ, viên thuốc hình thoi chứa hoạt chất trong nền có mùi thơm, thường là sucroza và acacia hoặc tragacanth; và thuốc có mùi thơm chứa hợp chất trong nền trơ như gelatin và glyxerin hoặc sucroza và acacia.

Dược phẩm cũng có thể được sử dụng bởi chế phẩm giải phóng có kiểm soát và/hoặc thiết bị phân phối (xem, ví dụ, trong patent Mỹ số 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 và 5,733,566).

Các hệ phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để dùng polypeptit PH20 tan được được chọn, như nhưng không bị giới hạn ở, bao nang trong liposom, vi hạt, viên vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện hợp chất, sự nhập bào được điều khiển bởi thụ thể, và sự phân phối của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit PH20 tan được được chọn như hệ phân phối retrovirut.

Do đó, theo các phương án nhất định, liposom và/hoặc các hạt nano cũng có thể được sử dụng với việc sử dụng polypeptit PH20 tan được. Liposom được tạo thành từ phospholipit mà được phân tán trong môi trường nước và tự phát tạo thành túi hai lớp đồng tâm đa phiến mỏng (còn được gọi là túi đa phiến mỏng (MLV)). MLV thường có đường kính nằm trong khoảng từ 25 nm đến 4 μm. Việc nghiền siêu âm MLV dẫn đến tạo thành các túi một phiến mỏng nhỏ (SUV) với đường kính nằm trong khoảng từ 200 đến 500 ăngstrom chứa dung dịch gốc nước trong lõi.

Phospholipit có thể tạo thành nhiều cấu trúc khác ngoài liposom khi được phân tán trong nước, phụ thuộc vào tỷ lệ mol của lipit so với nước. Ở tỷ lệ thấp, liposom tạo thành. Các đặc điểm vật lý của liposom phụ thuộc vào độ pH, cường độ ion và sự có mặt của các cation hóa trị hai. Liposom có thể thể hiện độ thấm thấp đối với chất dạng ion và phân cực, nhưng ở nhiệt độ cao trải qua quá trình chuyển pha, quá trình này làm thay đổi một cách rõ rệt độ thấm của chúng. Sự chuyển pha bao gồm sự thay đổi từ cấu trúc được đóng gói một cách chặt chẽ, có trật tự, được gọi là trạng thái gel, đến cấu trúc được đóng gói một cách lỏng lẻo, ít có trật tự hơn, được gọi là trạng thái lỏng. Điều này xảy ra ở nhiệt độ chuyển pha đặc trưng và dẫn đến làm tăng độ thấm đối với ion, đường và thuốc.

Liposom tương tác với tế bào thông qua các cơ chế khác nhau: sự nhập bào bởi các tế bào thực bào của hệ lưới nội mô như đại thực bào và bạch cầu trung tính; sự hút bám bề mặt tế bào, bằng lực kỵ nước yếu không đặc hiệu hoặc lực tĩnh điện, hoặc bằng tương tác đặc hiệu với thành phần bề mặt tế bào; sự dung hợp với màng tế bào huyết tương bằng sự chèn của lớp kép lipit của liposom vào màng huyết tương, với sự giải phóng đồng thời của các hàm lượng liposom vào bào chất; và bằng cách chuyển lipit thuộc liposom vào màng tế bào hoặc màng dưới tế bào, hoặc ngược lại, mà không có sự kết hợp bất kỳ của các hàm lượng liposom. Việc thay đổi chế phẩm liposom có thể thay đổi cơ chế đang sử dụng, mặc dù nhiều hơn một cơ chế có thể hoạt động cùng lúc. Viên nang nano có thể thường bao hợp chất theo cách ổn định và có thể tái sản xuất được. Để tránh tác dụng phụ do sự quá tải polyme nội bào, các hạt siêu mịn như vậy (kích thước khoảng 0,1 μm) phải được thiết kế bằng cách sử dụng polyme có khả năng được phân hủy *in vivo*. Các vi hạt nano polyalkyl-xyanoacrylat có khả năng phân hủy sinh học mà đáp ứng các yêu cầu này được dự tính để sử dụng trong bản mô tả này, và các hạt này có thể được tạo ra một cách dễ dàng.

4. Liều lượng và cách dùng

Polypeptit PH20 tan được, bao gồm esPH20, được được đề xuất trong bản mô tả này có thể được bào chế làm dược phẩm, thường để dùng liều đơn hoặc đa liều. Enzym phân hủy hyaluronan được chọn được bao gồm với lượng đủ để tạo ra hiệu quả hữu dụng về mặt trị liệu mà không có các tác dụng phụ không mong muốn ở bệnh nhân được điều trị. Nồng độ có hiệu quả trị liệu có thể được xác định dựa vào kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm polypeptit ở hệ in vitro và in vivo đã biết, như bằng cách sử dụng các thử nghiệm

được đề xuất trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, 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; ngoài ra, chẳng hạn, xem, Shimizu et al. (1994) *J. Virol.* 68:8406-8408; Mizutani et al. (1996) *J. Virol.* 70:7219-7223; Mizutani et al. (1996*) Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:822-826; Lu et al. (1996*) Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 93:1412-1417; Hahm et al., (1996) *Virology*, 226:318-326; Ito et al. (1996) *J. Gen. Virol.,*77:1043-1054; Mizutani et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212:906-911; Cho et al. (1997) *J. Virol. Meth.* 65:201-207 và sau đó ngoại suy từ đó đối với liều cho người.

Thông thường, liều có hiệu quả điều trị của enzym PH20 tan được là ở hoặc từ khoảng 10 Đơn vị (U) đến 500.000 Đơn vị, 100 Đơn vị đến 100.000 Đơn vị, 500 Đơn vị đến 50.000 Đơn vị, 1000 Đơn vị đến 10.000 Đơn vị, 5000 Đơn vị đến 7500 Đơn vị, 5000 Đơn vị đến 50.000 Đơn vị, hoặc 1000 Đơn vị đến 10.000 Đơn vị, thường từ 1000 đến 50.000 Đơn vị, trong dung dịch hoặc hỗn dịch được làm ổn định hoặc dạng được làm đông khô. Chế phẩm có thể được cung cấp ở dạng liều đơn vị như, nhưng không bị giới hạn ở, ống thuốc tiêm, ống tiêm và viên nén hoặc viên nang được bao gói một cách riêng rẽ. Chất phân tán có thể được sử dụng một mình, hoặc với chất hữu hiệu về mặt dược lý khác hoặc chất trị liệu với tổng thể tích là 0,1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, hoặc 1-10 ml, thường là 10-50 ml.

Ví dụ, PH20 tan được, bao gồm esPH20, có thể được sử dụng dưới da ở hoặc khoảng 10 U, 20 U, 30 U, 40 U, 50 U, 100 U, 150 U, 200 U, 250 U, 300 U, 350 U, 400 U, 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, 800 U, 900 U, 1000 U, 2000 U, 3000 U, 4000 Đơn vị, 5,000 U hoặc nhiều hơn. Trong một số ví dụ, liều có thể được cung cấp dưới dạng tỷ lệ của lượng PH20 tan được so với chất trị liệu được sử dụng. Ví dụ, polypeptit PH20 tan được có thể được sử dụng ở 1 U hyaluronidaza/U chất trị liệu (1:1) đến 50:1 hoặc nhiều hơn, ví dụ, ở hoặc khoảng 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 hoặc nhiều hơn. Thông thường, thể tích của dung dịch tiêm hoặc dung dịch truyền của PH20 tan được được dự tính trong bản

mô tả này là từ tại hoặc khoảng 0,01 mL, 0,05 mL, 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml hoặc nhiều hơn. PH20 tan được có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc ở hoặc khoảng 100 U/ml, 150 U/ml, 200 U/ml, 300 U/ml, 400 U/ml, 500 U/mL, 600 U/mL, 800 U/mL hoặc 1000 U/mL, hoặc có thể được cung cấp ở dạng cô đặc hơn, ví dụ ở hoặc khoảng 2000 U/ml, 3000 Đơn vị/ml, 4000 U/ml, 5000 U/ml, 8000 U/ml, 10.000 U/mL hoặc 20.000 U/mL để sử dụng trực tiếp hoặc để pha loãng đến nồng độ hữu hiệu trước khi sử dụng. PH20 tan được có thể được cung cấp dưới dạng chế phẩm lỏng hoặc chế phẩm được làm đông khô.

5. Sự đóng gói, sản phẩm của quá trình sản xuất và kit

Dược phẩm chứa polypeptit PH20 tan được, bao gồm esPH20, hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit như vậy, hoặc dẫn xuất hoặc biến thể của chúng có thể được đóng gói dưới dạng sản phẩm bao gồm vật liệu đóng gói, dược phẩm hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh, và nhón biểu thị rằng PH20 tan được hoặc phân tử axit nucleic được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh. Hỗn hợp của PH20 hyaluronidaza tan được được chọn, hoặc dẫn xuất hoặc biến thể của chúng và chất trị liệu cũng có thể được đóng gói trong sản phẩm của quá trình sản xuất.

Sản phẩm của quá trình sản xuất được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm vật liệu đóng gói. Vật liệu đóng gói được sử dụng để đóng gói dược phẩm là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,323,907, 5,052,558 và 5,033,252. Ví dụ về vật liệu đóng gói dược phẩm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vỉ dạng phồng, chai, ống, dụng cụ để hít, bơm, túi, lọ nhỏ, vật chứa, ống tiêm, chai, và vật liệu đóng gói bất kỳ thích hợp cho chế phẩm được chọn và cách dùng và cách điều trị được đề xuất. Sản phẩm này có thể bao gồm kim hoặc các dụng cụ tiêm khác để tạo thuận lợi cho việc sử dụng (ví dụ dùng dưới da) cho mục đích tiêm cục bộ. Mảng rộng lớn của các chế phẩm chứa hợp chất và chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này được dự định bao gồm PH20 tan được, như esPH20, và chất trị liệu đã biết để điều trị bệnh hoặc rối loạn cụ thể. Việc lựa chọn sự đóng gói phụ thuộc vào PH20 tan được và/hoặc chất trị liệu, và việc chế phẩm như vậy sẽ được đóng gói cùng nhau hay được đóng gói riêng rẽ. Trong một ví dụ, PH20 tan được có thể được đóng gói

dưới dạng hỗn hợp với chất trị liệu. Trong ví dụ khác, các thành phần này có thể được đóng gói dưới dạng chế phẩm riêng rẽ.

Polypeptit PH20 tan được được chọn, như polypeptit esPH20, chất trị liệu và/hoặc sản phẩm của quá trình sản xuất của chúng cũng có thể được cung cấp dưới dạng bộ kit. Bộ kit có thể bao gồm dược phẩm được nêu trong bản mô tả này và thông tin để sử dụng được cung cấp dưới dạng sản phẩm của quá trình sản xuất. Ví dụ, polypeptit PH20 tan được có thể được cung cấp bằng thiết bị để sử dụng, như ống tiêm, dụng cụ xông hít, cốc đong liều, ống nhỏ giọt, hoặc vật dùng để bôi. Chế phẩm này có thể được chứa trong vật dụng để sử dụng hoặc có thể được cung cấp một cách riêng rẽ để được bổ sung vào sau đó. Kit có thể, tùy ý, bao gồm hướng dẫn sử dụng về liều, phác đồ liều và hướng dẫn về cách thức sử dụng. Kit cũng có thể bao gồm dược phẩm được nêu trong bản mô tả này và vật dụng để chẩn đoán. Ví dụ, kit này có thể bao gồm vật dụng để xác định nồng độ, lượng hoặc hoạt tính của proteaza được chọn ở đối tượng.

G. Thử nghiệm

Polypeptit PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit esPH20, là tan được và giữ được hoạt tính enzym hyaluronidaza. Polypeptit PH20 được glycosyl hóa tại vị trí N hoặc được glycosyl hóa một phần tại vị trí N được đề xuất trong bản mô tả này giữ được hoạt tính enzym hyaluronidaza. Hoạt tính của PH20 được đề xuất trong bản mô tả này bằng hoặc bằng khoảng 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc hơn so với hoạt tính của PH20 tương ứng không được cắt cụt ở đầu cùng C hoặc không được glycosyl hóa một phần tại vị trí N. Hoạt tính của polypeptit hyaluronidaza PH20 tan được, như esPH20, có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, thử nghiệm vi độ đục và thử nghiệm vi chuẩn độ sử dụng axit hyaluronic được biotin hóa. Hoạt tính và sự đánh giá có thể được tiến hành trên môi trường có điều kiện hoặc dịch nổi hoặc trên protein được tinh chế. Khả năng hòa tan của protein cũng có thể được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm phân chia Triton® X-114. Trong tất cả các thử nghiệm, hoạt tính hoặc khả năng hòa tan của PH20 tan được có thể được so sánh với đối chứng, ví dụ, PH20 chiều dài đầy đủ không có các phần cắt cụt ở đầu cùng C.

1. Hoạt tính hyaluronidaza

Hoạt tính của polypeptit PH20 tan được có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thử nghiệm USP XXII đối với hyaluronidaza xác định hoạt tính một cách gián tiếp bằng cách xác định lượng axit hyaluronic chưa được phân hủy, hoặc cơ chất hyaluronan (HA) còn lại sau khi enzym được cho phản ứng với HA trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Chuẩn tham chiếu hyaluronidaza (USP) hoặc dung dịch hyaluronidaza chuẩn thuộc công thức quốc gia (NF) có thể được sử dụng trong thử nghiệm để xác định hoạt tính, tính bằng đơn vị, của hyaluronidaza bất kỳ.

Trong một ví dụ, hoạt tính được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm vi độ đục, như được nêu trong Ví dụ 12. Thử nghiệm này dựa trên sự tạo thành chất kết tủa không tan khi axit hyaluronic liên kết với albumin huyết thanh. Hoạt tính được xác định bằng cách ủ hyaluronidaza với natri hyaluronat (axit hyaluronic) trong khoảng thời gian đã đặt (ví dụ 10 phút) và sau đó làm kết tủa natri hyaluronat chưa được cắt bằng cách bổ sung albumin huyết thanh được axit hóa. Độ đục của mẫu thu được được xác định ở bước sóng 640 nm sau giai đoạn phát triển bổ sung. Sự giảm độ đục do hoạt tính hyaluronidaza trên cơ chất natri hyaluronat là thước đo của hoạt tính enzym hyaluronidaza.

Trong ví dụ khác, hoạt tính hyaluronidaza được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm vi chuẩn độ trong đó axit hyaluronic được biotin hóa còn dư được xác định sau khi ủ với hyaluronidaza (xem ví dụ Frost and Stern (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20050260186). Trong Ví dụ 4, hoạt tính hyaluronidaza của hyaluronidaza PH20 được cắt cụt của người được xác định bằng cách sử dụng axit hyaluronic được biotin hóa. Nhóm carboxyl tự do trên gốc axit glucuronic của axit hyaluronic được biotin hóa, và cơ chất axit hyaluronic được biotin hóa được liên kết cộng hóa trị với đĩa vi phiến. Sau khi ủ với hyaluronidaza, cơ chất axit hyaluronic được biotin hóa còn dư được phát hiện bằng cách sử dụng phản ứng avidin-peroxidaza, và so sánh với cơ chất còn dư thu được sau phản ứng với mẫu chuẩn hyaluronidaza có hoạt tính đã biết. Vì cơ chất được liên kết cộng hóa trị với đĩa vi phiến, thành phần lạ như sự chiếm chỗ phụ thuộc pH của cơ chất được biotin hóa không xảy ra. Độ nhạy cho phép xác định nhanh chóng hoạt tính hyaluronidaza từ tế bào được nuôi cấy và các mẫu sinh học với sự biến thiên bên trong thử nghiệm nhỏ hơn 10%.

Các thử nghiệm khác để xác định hoạt tính hyaluronidaza cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng trong các phương pháp trong bản mô tả này (xem ví dụ Delpech et al., (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41; Takahashi et al., (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

Nhiều thử nghiệm hyaluronidaza đã dựa trên việc xác định sự tạo thành của các nhóm N-axetylamino khử mới (Bonner and Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13:746-752, 1966), hoặc sự giảm độ nhớt (De Salegui et al., *Arch. Biochem. Biophys.*121:548-554, 1967) hoặc độ đục (Dorfman and Ott, *J. Biol. Chem.* 172:367, 1948). Với cơ chất được tinh chế tất cả các phương pháp này đủ để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của hoạt tính endoglucosamidic.

Cơ chất glycosaminoglycan gần như tinh khiết cũng có thể được sử dụng trong thử nghiệm Gel Shift. Glycosaminoglycan được trộn với PH20 tái tổ hợp, như PH20 tan được, để kiểm tra hoạt tính endoglucosidaza mà dẫn đến sự thay đổi tính di động của cơ chất trong gel. Ví dụ về cơ chất như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chondroitin-4 và 6 sulfat, dermatan sulfat, heparan-sulfat, mà có thể thu được từ Sigma Chemical. Hyaluronan dây rốn của người có thể thu được từ ICN. Ví dụ, mỗi cơ chất thử nghiệm có thể được pha loãng ở hoặc khoảng 0,1 mg/ml trong đệm khoảng pH 3,5-7,5. Trong thử nghiệm nêu làm ví dụ như vậy, ở hoặc khoảng 10 µl mẫu của PH20 tan được được tinh chế hoặc môi trường có điều kiện từ tế bào biểu hiện PH20 có thể được trộn với hoặc khoảng 90 µl cơ chất thử nghiệm trong đệm mong muốn và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, mẫu được trung hòa bằng đệm mẫu (Tris EDTA pH 8,0, Bromophenol Blue và glyxerol) sau đó là điện di. Glycosaminoglycan có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, glycosaminoglycan có thể được phát hiện bằng cách nhuộm gel sử dụng 0,5% xanh dương Alcian trong axit axetic băng 3% qua đêm sau đó làm mất màu trong axit axetic băng 7%. Sự phân hủy được xác định bằng các so sánh sự di động của cơ chất trong sự có mặt và vắng mặt của enzym.

Hoạt tính hyaluronidaza cũng có thể được phát hiện bởi zymography gel cơ chất (Guentenhoner et al., 1992, *Matrix* 388-396). Trong thử nghiệm này mẫu được đưa vào gel SDS-PAGE chứa axit hyaluronic và protein trong mẫu được tách riêng bằng cách điện di. Sau đó, gel được ủ trong đệm thử nghiệm enzym và sau đó nhuộm để phát hiện

axit hyaluronic trong gel. Hoạt tính hyaluronidaza được quan sát bằng mắt thường dưới dạng vùng được phát quang trong gel cơ chất.

Khả năng polypeptit PH20 tan được hoạt động dưới dạng chất phân bố hoặc khuếch tán cũng có thể được đánh giá. Ví dụ, thuốc nhuộm xanh dương trypan có thể được tiêm dưới da với hoặc không với PH20 tan được vào da bên sườn trên mỗi phía của chuột trụi lông. Sau đó, diện tích thuốc nhuộm được xác định, như bằng thước micro panme, để xác định khả năng enzym phân hủy hyaluronan tác động dưới dạng chất phân bố (patent Mỹ số 20060104968). Ảnh hưởng của việc đồng sử dụng hyaluronidaza với chất khác, ví dụ chất trị liệu, đến các tính chất dược động học và dược lực học của chất đó cũng có thể được đánh giá *in vivo* sử dụng mô hình thử nghiệm ở động vật và/hoặc đối tượng là người, như trong việc thiết lập thử nghiệm lâm sàng.

Hoạt tính chức năng của PH20 tan được, như esPH20 có thể được so sánh với và/hoặc được chuẩn hóa với mẫu chuẩn tham chiếu bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm này. Điều này có thể được tiến hành để xác định lượng tương đương về mặt chức năng của PH20 tan được là gì. Ví dụ, khả năng PH20 tan được tác động dưới dạng chất phân bố hoặc khuếch tán có thể được đánh giá bằng cách tiêm nó vào da bên sườn của chuột với trypan xanh dương, và lượng cần để đạt được cùng lượng khuếch tán, ví dụ, 100 đơn vị mẫu chuẩn tham chiếu hyaluronidaza, có thể được xác định. Do vậy, lượng PH20 tan được cần thiết này tương đương về mặt chức năng với 100 đơn vị hyauronidaza.

2. Khả năng hòa tan

Khả năng hòa tan của hyaluronidaza có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Một phương pháp để xác định khả năng hòa tan là bằng sự phân bố chất tẩy rửa. Ví dụ, polypeptit PH20 tan được có thể được phân biệt, ví dụ, bằng sự phân bố của nó vào pha nước chứa dung dịch Triton® X-114 ở nhiệt độ 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-1607). Ví dụ, khả năng hòa tan của polypeptit PH20 được nêu trong bản mô tả này được đánh giá như được nêu trong Ví dụ 4. Hyaluronidaza được bám màng, như hyaluronidaza được bám lipit, bao gồm hyaluronidaza được gắn neo GPI, sẽ phân bố vào pha giàu chất tẩy rửa, nhưng sẽ phân bố vào pha nước hoặc pha ít chất tẩy rửa sau khi xử lý bằng Phospholipaza C. Phospholipaza C là enzym phân cắt liên kết phospho-glyxerol được tìm

thấy trên protein được gắn neo GPI. Việc xử lý bằng PLC sẽ gây ra sự giải phóng protein được liên kết GPIkhỏi màng tế bào phía ngoài.

Phương pháp khác để đánh giá khả năng hòa tan là xác định xem polypeptit PH20 có được gắn neo GPI hay không. Polypeptit PH20 được gắn neo GPI được liên kết với màng tế bào và do vậy không tan được. Để xác định xem polypeptit PH20 có được gắn neo GPI hay không, có thể đánh giá khả năng hòa tan trước và sau quá trình thủy phân PLC/PLD, và cũng sử dụng thuật toán có tính chất dự đoán để nhận biết trình tự tín hiệu gắn neo GPI. Protein được gắn neo GPI có thể được nhận dạng bởi sự hòa tan hóa của chúng sau khi phân cắt bằng hóa học hoặc enzym đặc hiệu, cùng với sự phân bố vào chất tẩy rửa (ví dụ, trong Triton® X-114), sự nhận biết kháng thể, và đánh dấu phóng xạ chuyển hóa.

Phương pháp chung được sử dụng để chứng tỏ rằng protein có neo GPI là sự giải phóng của nó khỏi bề mặt tế bào hoặc sự hòa tan hóa của nó bằng cách xử lý bằng PI-PLC vi khuẩn hoặc phospholipaza C đặc hiệu GPI có nguồn gốc từ trypanosom (GPI-PLC). Các enzym này phân cắt diaxylglyxerol trong màng và sản xuất epitop glycan phản ứng miễn dịch (CRD) trên protein, mà có thể được phát hiện bởi kỹ thuật thẩm tách Western với kháng thể được tạo ra chống lại GPI của trypanosom. Một vấn đề phổ biến với phương pháp này đặc biệt gặp phải ở tế bào của động vật có vú là ở chỗ lipaza không thể phân cắt neo GPI trong đó inositol được axyl hóa. Các lipaza này yêu cầu xử lý trước bằng chất kiềm nhẹ để loại bỏ axit béo trên vòng inositol. Theo cách khác, phospholipaza D đặc hiệu GPI có nguồn gốc từ huyết thanh có thể được sử dụng để phân cắt neo GPI. Enzym này phân cắt giữa vòng inositol và gốc axit phosphatidic và không bị ức chế bởi sự axyl hóa inositol. Axit flohydric phân cắt neo GPI giữa vòng inositol và axit phosphatidic và cũng phân cắt liên kết phosphodieste giữa phosphoetanolamin bất kỳ và các gốc manosyl. Axit nitrơ loãng là đặc biệt hữu dụng trong nghiên cứu về neo GPI vì nó phân cắt một cách đặc hiệu giữa glucosamin không được axetyl hóa và vòng inositol, giải phóng glycan được liên kết protein (bây giờ chứa gốc anhydromanoza chẩn đoán) và phosphatidylinositol. Kết hợp với kháng thể CRD, phân tích chế phẩm, đánh dấu phóng xạ với myo-inositol, etanolamin, glucosamin, manoza, hoặc axit béo và các phương pháp sắc ký hoặc phân bố chất tẩy rửa, các phương pháp phân hủy này là bộ công cụ mạnh để nghiên cứu neo GPI trên protein.

Các phương pháp và thuật toán *in silico* khác nhau đã được phát triển mà có thể được sử dụng để nhận biết trình tự liên ứng tín hiệu gắn neo GPI trong polypeptit (xem, ví dụ Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 292: 741-758, Kronegg và Buloz, (1999); "Detection/prediction of GPI cleavage site (Neo GPI) in protein (DGPI)", 129,194,185,165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392); bao gồm các phương pháp có sẵn trên trang web tin sinh, như trang công cụ ExPASy Proteomics (expasy.ch/tools/). Như vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định xem polypeptit PH20 có chứa trình tự tín hiệu gắn neo GPI hay không, và, do vậy, polypeptit PH20 có là protein được gắn neo GPI hay không.

H. Các phương pháp xử lý và sử dụng PH20 kéo dài tan được và các PH20 tan được khác và trị liệu kết hợp

Các dạng khác nhau của PH20 hyaluronidazađược điều chế và được chấp thuận để ứng dụng trị liệu ở người. Ví dụ, chế phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc từ động vật bao gồm Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), hyaluronidaza từ tinh hoàn cừu được tinh chế, và Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), hyaluronidaza tinh hoàn bò. Hylenx® (Halozyme Therapeutics) là hyaluronidaza tái tổ hợp của người được tạo ra bởi các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được thiết kế di truyền chứa axit nucleic mã hoá rHuPH20 tan được. Các ứng dụng trị liệu được chấp thuận chohyaluronidaza bao gồm việc sử dụng làm chất bổ trợ để làm tăng sự hấp thụ và sự phân tán của các chất trị liệu khác, để truyền khối lượng lớn dung dịch (dùng chất lỏng dưới da), và để làm chất phụ trợ trong chụp liệu dưới da để cải thiện sự tái hấp thụ của chất cản bức xạ. Ngoài các ứng dụng này, hyaluronidaza còn có thể được sử dụng làm chất trị liệu hoặc mỹ phẩm để điều trị bệnh và tình trạng bệnh bổ sung.

Hyaluronidaza cũng được sử dụng để tăng cường hoạt tính của chất hóa trị liệu và/hoặc khả năng tiếp cận của khối u với chất hóa trị liệu (Schuller et al., 1991, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 32:173, số tóm tắt 1034; Czejka et al., 1990, *Pharmazie*45:H.9). Việc hóa trị liệu kết hợp với hyaluronidaza là có hiệu quả trong việc điều trị nhiều bệnh ung thư khác nhau bao gồm ung thư bàng quang (Horn et al., 1985, *J. Surg. Oncol.* 28:304-307), ung thư biểu mô tế bào có vảy (Kohno et al., 94, *J. Cancer*

Res. Oncol. 120:293-297), ung thư vú (Beckenlehner et al., 1992, *J. Cancer Res. Oncol.* 118:591-596), và ung thư dạ dày-ruột (Scheithauer et al., 1988, *Anticancer Res.* 8:391-396). Hyaluronidaza là có hiệu quả làm chất trị liệu duy nhất trong điều trị ung thư não (u thần kinh đệm) (công bố đơn Quốc tế số WO88/02261, ngày công bố 7/4/1988). Việc sử dụng hyaluronidaza cũng gây ra sự đáp ứng của khối u kháng hóa trị liệu trước đây của tuyến tụy, dạ dày, ruột kết, buồng trứng, và vú (Baumgartner et al., 1988, *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker et al., 1986, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390). Điều không may là, các chất nhiễm tạp và bản chất không phải người của các hyaluronidaza này gây ra các phản ứng quá mẫn.

Ngoài hiệu quả kháng ung thư gián tiếp của nó, hyaluronidaza còn có hiệu quả chống chất sinh ung thư trực tiếp. Hyaluronidaza ngăn ngừa sự phát triển của khối u được cấy vào chuột (De Maeyer et al., 1992, *Int. J. Cancer* 51:657-660) và ức chế sự tạo thành khối u trong quá trình tiếp xúc với chất sinh ung thư (Pawlowski et al., 1979, *Int. J. Cancer* 23:105-109; Haberman et al., 1981, Proceedings of 17th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, tóm tắt số 415).

Cụ thể, PH20 hyaluronidaza có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan có liên quan đến áp suất chất lỏng trong kẽ cao, như áp suất đĩa đệm, các rối loạn tăng sinh, như ung thư và sự tăng sản tuyến tiền liệt lành tính, và bệnh phù. Bệnh phù có thể tạo ra từ hoặc được biểu lộ, ví dụ, từ cấy ghép cơ quan, đột quỵ hoặc chấn thương não. Các rối loạn tăng sinh bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư, sự tăng sinh tế bào cơ trơn, xơ cứng toàn thân, bệnh xơ gan, hội chứng suy hô hấp ở người trưởng thành, bệnh cơ tim tự phát, luput ban đỏ, bệnh võng mạc, ví dụ, bệnh võng mạc tiểu đường hoặc các bệnh võng mạc khác, sự tăng sản tim, các rối loạn có liên quan đến hệ thống sinh sản, như sự tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH) và u nang buồng trứng, bệnh xơ hoá phổi, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh u xơ, khối máu tụ, u bạch huyết, bệnh sacoit, khối u xơ. Ung thư bao gồm khối u rắn và khối u bạch huyết/máu và bệnh di căn, và khối u chưa được biệt hóa. Khối u tuân theo sự điều trị thường thể hiện sự biểu hiện ở tế bào và/hoặc thể đệm của hyaluronan, so với mô không ung thư của cùng loại mô hoặc so với khối u không di căn của cùng loại khối u. Ung thư bao gồm một hoặc nhiều loại bất kỳ trong số các bệnh ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô tại chỗ (ISC), ung thư biểu mô tế bào có vảy (SCC), ung thư tuyến tiền liệt,

ung thư tụy, các ung thư dạ dày khác, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư vú, ung thư não và ung thư ruột kết.

Do đó, PH20 hyaluronidaza có nhiều ứng dụng, bao gồm và ngoài việc sử dụng chúng làm chất phân bố. Hyaluronidaza thường được sử dụng, ví dụ, cho khối quanh cầu mắt trong quá trình gây tê cục bộ trước khi mổ mắt. Sự có mặt của enzym này ngăn ngừa nhu cầu đối với các khối bổ sung và đẩy nhanh thời gian bắt đầu mất vận động (mất cử động của mắt). Khối quanh cầu mắt và dưới Tenon là ứng dụng phổ biến nhất của hyaluronidaza đối với quy trình chữa mắt. Hyaluronidaza cũng có thể đẩy nhanh thời gian bị mất vận động trong phẫu thuật thẩm mỹ, như tạo mi và nâng mặt. Cần phải hiểu rằng hyaluronidaza PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm hyaluronidaza esPH20, có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc trị liệu kết hợp bất kỳ trong đó hyaluronidaza PH20 được sử dụng (xem ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20040268425; US20050260186; US20060104968; và các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 và 12/386,222). Các ứng dụng trị liệu là thẩm mỹ nêu làm ví dụ của hyaluronidaza được mô tả dưới đây.

1.Sử dụng làm chất phân bố và trị liệu kết hợp

Như được lưu ý ở trên, hyaluronidaza là chất phân bố hoặc khuếch tán mà biến đổi độ thẩm của mô liên kết thông qua quá trình thủy phân của axit hyaluronic, polysacarit được tìm thấy trong chất nền gian bào của mô liên kết, và của một số mô chuyên hóa nhất định, như dây rốn và thể kính. Khi không có yếu tố phân bố nào có mặt, các nguyên liệu được tiêm dưới da, như thuốc, protein, peptit và axit nucleic, phân bố rất chậm. Tuy nhiên, việc đồng tiêm với hyaluronidaza, có thể tạo ra sự phân bố nhanh chóng. Tốc độ khuếch tán tỷ lệ với lượng enzym này, và mức độ khuếch tán tỷ lệ với thể tích của dung dịch.

PH20, bao gồm PH20 tan được như esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được sử dụng để thúc đẩy hoặc tăng cường chất và phân tử phân phối đến bất kỳ trong số nhiều mô khác nhau của động vật có vú *in vivo*. Nó có thể được sử dụng để thúc đẩy sự khuếch tán, do vậy, thúc đẩy sự phân phối, của dược chất phân tử nhỏ cũng như dược chất phân tử lớn hơn, như protein, axit nucleic và axit ribonucleic, và chế phẩm đại phân tử mà có thể chứa hỗn hợp của các thành phần bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axit nucleic, protein, hydrat cacbon, lipit, phân tử và thuốc gốc lipit (xem ví dụ Công bố đơn

yêu cầu cấp patent Mỹ số US20040268425; US20050260186; và US20060104968). PH20, bao gồm PH20 tan được như esPH20 có thể được đồng sử dụng và/hoặc được đồng bào chế với chất trị liệu để cải thiện độ sinh khả dụng cũng như các tính chất được động học (PK) và/hoặc dược lực học (PD) của chất được đồng bào chế hoặc được đồng sử dụng. Các thông số PK/PD mà có thể được cải thiện bằng cách sử dụng PH20 tan được, như esPH20, bao gồm các thông số như C_{max} (nồng độ cực đại của chất đạt được sau khi hấp thụ trong, *ví dụ*, dòng máu trong cơ thể), T_{max} (thời gian cần để đạt được nồng độ cực đại), $T_{1/2}$ (thời gian cần để nồng độ giảm đi một nửa), C_{min} (nồng độ tối thiểu của chất sau khi trao đổi chất và bài tiết), AUC (diện tích bên dưới đường cong của nồng độ so với thời gian, là thước đo của tổng lượng của độ sinh khả dụng), nồng độ trong các mô khác nhau được quan tâm (bao gồm, *ví dụ*, tốc độ đạt được nồng độ mong muốn, mức tổng cộng, và thời gian duy trì mức độ mong muốn), và E_{max} (hiệu quả tối đa đạt được).

Các phương pháp điều trị được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm các trị liệu kết hợp với chất trị liệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn mà chất trị liệu này có tác động đến. Chất trị liệu bất kỳ mà cải thiện và hoặc làm giảm bớt mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh có thể được kết hợp với PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này để làm tăng độ sinh khả dụng của chất trị liệu này. Cụ thể, polypeptit PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này, như esPH20, có thể được sử dụng trong mỗi hỗn hợp và trong tất cả các hỗn hợp được bộc lộ trong các đơn, xem ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20040268425; US20050260186; US20060104968 và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 và 12/386,222 thay cho enzym phân hủy hyaluronidaza hoặc hyaluronidazađược bộc lộ.

Polypeptit PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này, cụ thể là polypeptit esPH20, có thể được sử dụng trước, sau, không liên tục hoặc đồng thời với chế phẩm chất trị liệu. Thông thường, PH20 tan được được sử dụng trước hoặc đồng thời với việc sử dụng chế phẩm chất trị liệu để cho phép PH20 tan được phân hủy axit hyaluronic trong khoảng trống kẽ. PH20 tan được có thể được sử dụng ở vị trí khác với vị trị sử dụng phân tử trị liệu hoặc PH20 tan được có thể được sử dụng ở vị trí giống như vị trí sử dụng phân tử trị liệu.

Ví dụ về chất và phân tử dược, trị liệu và thẩm mỹ có thể được sử dụng với hyaluronidaza bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất hóa trị liệu hoặc chất chống ung

thư, thuốc làm giảm đau, chất kháng sinh, chất kháng viêm, chất kháng khuẩn, chất diệt amip, chất diệt động vật nguyên sinh có chân mao (trichomonas), chất chống bệnh parkinson, chất chống bệnh sốt rét, chất chống co giật, chất giảm đau, chất chống viêm khớp, chất chống nấm, chất chống tăng huyết áp, chất hạ sốt, chất chống vật ký sinh, chất kháng histamin, chất chủ vận alpha-adrenergic, chất phong bế alpha, chất gây mê, chất giãn phế quản, thuốc diệt sinh vật, chất diệt vi khuẩn, chất kìm hãm vi khuẩn, chất phong bế beta adrenergic, chất phong bế kênh canxi, thuốc tim mạch, thuốc tránh thai, chất làm đẹp hoặc thẩm mỹ, thuốc làm thông mũi, chất lợi tiểu, chất giảm đau, chất chẩn đoán, chất điện giải, thuốc ngủ, chất hormon, chất tăng glucoza huyết, chất giãn cơ, chất co cơ, thuốc chữa mắt, chất tác dụng giống thần kinh đối giao cảm, chất tăng tinh thần, thuốc an thần, chất gây ngủ, chất kích thích thần kinh giao cảm, thuốc an thần, chất điều trị tiết niệu, chất tác động ở âm đạo (chất trị bệnh ở âm đạo), thuốc diệt virut, chất vitamin, chất kháng viêm không steroit, hoặc chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, và hỗn hợp bất kỳ của chúng. Cụ thể, chất trị liệu bao gồm kháng thể, kể cả kháng thể đơn dòng, bisphosphonat, insulin và globulin miễn dịch.

Ví dụ, chất kháng sinh nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Aminoglycosit; Amphenicol; Ansamyxin; Carbacephem; Carbapenem; Cephalosporin hoặc Cephem; Cephamyxin; Clavam; lipopeptit vòng; Diaminopyrimidin; Ketolit; Lincosamit; Macrolit; Monobactam; Nitrofuran; Oxacephem; Oxazolidinon; Penem, thienamyxin và beta-lactam hỗn tạp; Penixilin; chất kháng sinh polypeptit; Quinolon; Sulfonamit; Sulfon; Tetraxyclin; và các chất kháng sinh khác (như Clofoctol, axit Fusidic, Hexedin, Methenamin, Nitrofurantoin Nitroxolin, Ritipenem, Taurolidin, Xibomol).

Cũng được bao gồm trong số các chất trị liệu nêu làm ví dụ là các chất biến đổi máu như yếu tố chống bệnh ưa chảy máu, phức hợp chất chống đông máu chống ức chế, kháng trombin III, Yếu tố đông máu Vh, Yếu tố làm đông máu VIII, Yếu tố làm đông máu IX, phân đoạn protein huyết tương, yếu tố von Willebrand; chất hủy tiểu cầu (bao gồm, ví dụ, abciximab, anagrelit, cilostazol, clopidogrel bisulfat, dipyridamol, epoprostenol, eptifibatit, tirofiban; yếu tố kích thích khuẩn lạc (CSF) (bao gồm, ví dụ, CSF bạch cầu hạt và CSF đại thực bào dạng hạt); chất kích thích tạo hồng cầu (bao gồm, ví dụ, erythropoietin như darbepoetin alfa) và epoetin alfa; chất cầm máu và albumin (bao

gồm, ví dụ, aprotinin, hỗn hợp của yếu tố chống bệnh ưa chảy máu và huyết tương, Desmopressin Axetat, và albumin); globulin miễn dịch, cũng như globulin miễn dịch bệnh viêm gan B; chất ức chế thrombin (bao gồm ví dụ chất ức chế thrombin trực tiếp và lepirudin), và drotecogin alfa; chất chống đông máu (bao gồm, ví dụ, dalteparin, enoxaperin và các heparin khác, và warfarin).

Các chất trị liệu nêu làm ví dụ khác mà có thể được kết hợp bằng cách đồng sử dụng và/hoặc đồng bào chế với PH20 tan được, như esPH20, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Adalimumab, Agalsidaza Beta, Alefacept, Ampixilin, Anakinra, vacxin Antipoliomyelitic, Kháng tế bào tuyến ức, Azithromyxin, Becaplermin, Caspofungin, Cefazolin, Cefepim, Cefotetan, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cetuximab, Cilastatin, Axit Clavulanic, Clindamyxin, Darbepoetin Alfa, Deaclizumab, Diphtheria, kháng độc tố bệnh bạch hầu, Diphtheria Toxoid, Efalizumab, Epinephrin, Erythropoietin Alpha, Etanercept, Filgrastim, Fluconazol, hormon kích thích tạo nang, Follitropin Alpha, Follitropin Beta, Fosphenyloin, Gadodiamit, Gadopentetat, Gatifloxacin, Glatiramer, GM-CSF, Goserelin, Goserelin axetat, Granisetron, *Haemophilus Influenza* B's, Haloperidol, vacxin chống bệnh viêm gan, vacxin chống bệnh viêm gan A, vacxin chống bệnh viêm gan B, Ibritumomab Tiuxetan, Ibritumomab, Tiuxetan, Globulin miễn dịch, vacxin Hemophilus influenza, vacxin chống virut gây bệnh cúm, Infliximab, Insulin, Insulin Glargin, Interferon, Interferon alpha, Interferon Beta, Interferon Gama, Interferon alpha-2a, Interferon alpha-2b, Interferon alpha-1, Interferon alpha-n3, Interferon Beta, Interferon Beta-1a, Interferon Gama, Interferon alpha-liên ứng, Iodixanol, Iohexol, Iopamidol, Ioversol, Ketorolac, Laronidaza, Levofloxacin, Lidocain, Linezolit, Lorazepam, vacxin phòng bệnh sởi, virut sởi, virut quai bị, vacxin phòng virut Sởi-Quai bị-Rubella, vacxin phòng Rubella, Medroxyprogesteon, Meropenem, Metylprednisolon, Midazolam, Morphin, Octreotit, Omalizumab, Ondasetron, Palivizumab, Pantoprazol, Pegaspargaza, Pegfilgrastim, Peg-Interferon Alfa-2a, Peg-Interferon Alfa-2b, Pegvisomant, vacxin phòng chứng ho lâu ngày, Piperacillin, vacxin Pneumococcal và vacxin Pneumococcal Conjugate, Promethazin, Reteplaza, Somatropin, Sulbactam, Sumatriptan, Tazobactam, Tenecteplaza, độc tố uốn ván được tinh chế, Ticarcillin, Tositumomab, Triamcinolon, Triamcinolon Axetonit, Triamcinolon hexaxetonit, Vancomyxin, Varicella Zoster globulin miễn dịch, vacxin Varicella, các vacxin khác,

Alemtuzumab, Alitretinoin, Allopurinol, Altretamin, Amifostin, Anastrozol, Arsenic, Arsenic Trioxit, Asparaginaza, vacxin Bacillus Calmette-Guerin (BCG), BCG sống, Bexaroten, Bleomyxin, Busulfan, Busulfan trong tĩnh mạch, Busulfan đường miệng, Calusteron, Capecitabin, Carboplatin, Carmustin, Carmustin với Polifeprosan, Celecoxib, Chlorambucil, Cisplatin, Cladribin, Xyclophosphamit, Cytarabin, Cytarabin liposom, Dacarbazin, Dactinomyxin, Daunorubicin liposom, Daunorubicin, Daunomyxin, Denileukin Diftitox, Dexrazoxan, Docetaxel, Doxorubicin, Doxorubicin liposom, Dromostanolon propionat, Dung dịch Elliott's B, Epirubicin Epoetin alfa, Estramustin, Etoposit, Etoposit phosphat, Etoposit VP-16, Exemestan, Floxuridin, Fludarabin, Flouraxil, 5-Flouraxil, Fulvestrant, Gemcitabin, Gemtuzumab, Ozogamicin, Gemtuzumab ozogamicin, Hydroxyure, Idarubicin, Ifosfamit, Imatinib mesylat, Irinotecan, Letrozol, Leucovorins, Levamisol, Lomustin, CCNU, Mechlorethamin, N mù tạc, Megestrol, Megestrol axetat, Melphalan, L-PAM, Mercaptopurin, 6-Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Methoxsalen, Mitomyxin, Mitomyxin C', Mitotan, Mitoxantron, Nandrolon, Nandrolon Phenpropionat, Nofetumomab, Oprelvekin, Oxaliplatin, Paclitaxel, Pamidronat, Pegademaza, Pentostatin, Pipobroman, Plicamyxin, Mithramyxin, Porfimer, Porfimer natri, Procarbazin, Quinacrin, Rasburicaza, Rituximab, Sargramostim, Streptozocin, đá Tal, Tamoxifen, Temozolomit, Teniposit, Testolacton, Thioguanin, 6-Thioguanin, Trietylenthiophosphoramit (Thiotepa), Topotecan, Toremifen, Trastuzumab, Tretinoin, Uraxil Mù tạc, Valrubicin, Vinblastin, Vincristin, Vinorelbin, Zoledronat Acivicin, Aclarubicin, Acodazol, Acronin, Adozelesin, Aldesleukin, Axit Retinoic, Alitretinoin, Axit 9-Cis-Retinoic, Alvocidib, Ambazon, Ambomyxin, Ametantron, Aminoglutethimit, Amsacrin, Anaxiron, Ancitabin, Anthramyxin, Apaziquon, Argimesna, Asperlin, Atrimustin, Azacitidin, Azetepa, Azotomyxin, Banoxantron, Batabulin, Batimastat, Benaxibin, Bendamustin, Benzodepa, Bicalutamit, Bietaserpin, Biricodar, Bisantren, Bisnafit Dimesylat, Bizelesin, Bortezomib, Brequinar, Bropirimin, Budotitan, Cactinomyxin, Canertinib, Caracemit, Carbetimer, Carboquon, Carmofur, Carubicin, Carzelesin, Cedefingol, Cemadotin, Chiorambucil, Cioteronel, Cirolemyxin, Clanfenur, Clofarabin, Crisnatol, Decitabin, Dexniguldipin, Dexormaplatin, Dezaguanin, Diaziquon, Dibrospidium, Dienogest, Dinalin, Disermolit, Dofequidar, Doxifluridin, Droloxifen, Duazomyxin, Ecomustin, Edatrexat, Edotecarin, Eflomithin, Elacridar, Elinafit, Elsamitrucin, Emitefur, Enloplatin,

Enpromat, Enzastaurin, Epipropidin, Eptaloprost, Erbulozol, Esorubicin, Etanidazol, Etoglucid, Etoprin, Exisulind, Fadrozol, Fazarabin, Fenretinit, Fluoxymesteon, Flurocitabin, Fosquidon, Fostriecin, Fotretamin, Galarubicin, Galocitabin, Geroquinol, Gimatecan, Gimeracil, Gloxazon, Glufosfamit, Ilmofosin, Ilomastat, Imexon, Improsulfan, Indisulam, Inproquon, Interleukin, Interleukin-2, Interleukin tái tổ hợp, Intoplixin, Lobenguan, Iproplatin, Irsogladin, Ixabepilon, Ketotrexates, L-Alanosin, Lanreotit, Lapatinib, Ledoxantron, Leuprolit, Leuprorelins, Lexacalcitol, Liarozol, Lobaplatin, Lometrexol, Lonafarnib, Losoxantron, Lurtotecan, Mafosfamit, Mannosulfan, Marimastat, Masoprocol, Maytansin, Mechiorethamin, Melengestrol, Meiphalan, Menogaril, Mepitiostan, Metesind, Metomidat, Metoprin, Meturedepa, Miboplatin, Miproxifen, Misonidazol, Mitindomit, Mitocarcin, Mitocromin, Mitoflaxon, Mitogillin, Mitoguazon, Mitomalcin, Mitonafit, Mitoquidon, Mitosper, Mitozolomit, Mivobulin, Mizoribin, Mofaroten, Mopidamol, Mubritinib, Axit Mycophenolic, Nedaplatin, Neizarabin, Nemorubicin, Nitracrin, Nocodazol, Nogalamyxin, Nolatrexed, Nortopixantron, Ormaplatin, Ortataxel, Oteracil, Oxisuran, Oxophenarsin, Patubilon, Peldesin, Peliomyxin, Pelitrexol, Pemetrexed, Pentamustin, Peplomyxin, Perfosfamit, Perifosin, Picoplatin, Pinafit, Piposulfan, Pirfenidon, Piroxantron, Pixantron, Plevitrexed, Plomestan, Porfiromyxin, Prednimustin, Propamidin, Prospidium, Pumitepa, Puromyxin, Pyrazofurin, Ranimustin, Riboprin, Ritrosulfan, Rogletimit, Roquinimex, Rufocromomyxin, Sabarubicin, Safingol, Satraplatin, Sebriplatin, Semustin, Simtrazen, Sizofiran, Sobuzoxan, Sorafenib, Sparfosat, Axit Sparfosic, Sparsomyxin, Spirogermanium, Spiromustin, Spiroplatin, Squalamin, Streptonigrin, Streptovarycin, Sufosfamit, Sulofenur, Tacedinalin, Talisomyxin, Tallimustin, Tariquidar, Tauromustin, Tecogalan, Tegafur, Teloxantron, Temoporfin, Teroxiron, Thiamiprin, Tiamiprin, Tiazofurin, Tilomisol, Tiloron, Timcodar, Timonacic, Tirapazamin, Topixantron, Trabectedin, Ecteinascidin 743, Trestolon, Triciribin, Trilostan, Trimetrexat, Triplatin Tetranitrat, Triptorelin, Trofosfarnit, Tubulozol, Ubenimex, Uredepa, Vaispodar, Vapreotit, Verteporfin, Vinbiastin, Vindesin, Vinepidin, Vinflunin, Vinformit, Vinglycinat, Vinleucinol, Vinleurosin, Vinrosidin, Vintriptol, Vinzolidin, Vorozol, Xanthomyxin A, Guamexyclin, Zeniplatin, Zilascorb [2-H], Zinostatin, Zorubicin, Zosuquidar, Acetazolamit, Axyclovir, Adipiodon, Alatrofloxacin, Alfentanil, dịch chiết dị ứng nguyên, chất ức chế Alpha 1-proteinaza, Aiprostadil, Amikacin, Axit amin, axit

Aminocaproic, Aminophyllin, Amitriptylin, Amobarbital, Amrinon, Analgesic, vacxin phòng bệnh bại liệt, huyết thanh kháng bệnh dại, globulin miễn dịch chống bệnh uốn ván, vacxin phòng bệnh uốn ván, Kháng trombin III, huyết thanh kháng nọc độc, Argatroban, Arginin, axit Ascorbic, Atenolol, Atracurium, Atropin, Aurothioglucoza, Azathioprin, Aztreonam, Bacitracin, Baclofen, Basiliximab, axit Benzoic, Benztropin, Betamethason, Biotin, Bivalirudin, kháng độc tố ngộ độc thịt, Bretylium, Bumetanit, Bupivacain, Buprenorphin, Butorphanol, Calcitonin, Calcitriol, Canxi, Capreomyxin, Carboprost, Carnitin, Cefaniandol, Cefoperazon, Cefotaxim, Cefoxitin, Ceftizoxim, Cefuroxim, Chioramphenicol, Chioroprocain, Chioroquin, Chlorothiazit, Chiorpromazin, axit Chondroitinsulfuric, Choriogonadotropin alfa, Chromium, Cidofovir, Cimetidin, Ciprofloxacin, Cisatracurium, Clonidin, Codein, Coichixin, Colistin, Colagen, Corticorelin cừu triflutat, Corticotrophin, Cosyntropin, Xyanocobalamin, Xyclosporin, Xystein, Dacliximab, Dalfopristin, Dalteparin, Daaparoid, Datrolen, Deferoxamin, Desmopressin, Dexamethason, Dexmedetomidin, Dexpanthenol, dextran, sắt dextran, axit Diatrizoic, Diazepam, Diazoxit, Dixyclomin, Digibind, Digoxin, Dihydroergotamin, Diltiazem, Diphenhydramin, Dipyridamol, Dobutamin, Dopamin, Doxacurium, Doxapram, Doxercalciferol, Doxyxyclin, Droperidol, Dyphyllin, axit Edetic, Edrophonium, Enalaprilat, Ephedrin, Epoprostenol, Ergocalciferol, Ergonsheep, Ertapenem, Erythromyxin, Esmolol, Estradiol, Estrogenic, axit Ethacrynic, Etanolamin, Etanol, dầu Lipiodol, axit Etidronic, Etomidat, Yếu tố VIII, Famotidin, Fenoldopam, Fentanyl, Flumazenil, Fluorescein, Fluphenazin, axit Folic, Fomepizol, Fomivirsen, Fondaparinux, Foscarnet, Fosphenytoin, Furosemit, Gadoteridol, Gadoversetamit, Ganciclovir, Gentamicin, Glucagon, Glucoza, Glyxin, Glycopyrolat, Gonadorelin, Gonadotropin màng đệm, Haemophilus B polysacarit, Hemin, Herbal, Histamin, Hydralazin, Hydrocortison, Hydromorphon, Hydroxocobalamin, Hydroxyzin, Hyoscyamin, Ibutilit, Imigluceraza, Indigo carmin, Indomethacin, Ioddua, lopromit, axit Iothalamic, axit loxaglic, loxilan, Isoniazid, Isoproterenol, vacxin phòng viêm não Nhật Bản, Kanamyxins, Ketamin, Labetalol, Lepirudin, vacxin Levobupi, Levothyroxin, Lincomyxin, Liothyronin, hormon Luteinising, vacxin bệnh Lyme, Mangafodipir, Manthtol, vacxin Meningococcal polysacarit, Meperidin, vacxin Mepi, Mesoridazin, Metaraminol, Methadon, Methocarbamol, Methohexital, Metyldopates, Metylergonsheep, Metoclopramit, Metoprolol, Metronidazol, Minoxyclin, Mivacurium,

axit Morrhuic, Moxifloxacin, Muromonab-CD3, Mycophenolate mofetil, Nafcillin, Nalbuphin, Nalmefen, Naloxon, Neostigmin, Niacinamit, Nicardipin, Nitroglyxerin, Nitroprussit, Norepinephrin, Orphenadrin, Oxacillin, Oxymorphon, Oxytetraxyclin, Oxytocin, Pancuroni, Panthenol, axit Pantothenic, Papaverin, Peginterferon-alpha (ví dụ interferon alpha 2a hoặc 2b), Penixilin G, Pentamidin, Pentazoxin, Pentobarbital, Perfiutren, Perphenazin, Phenobarbital, Phentolamin, Phenylephrin, Phenytoin, Physostigmin, Phytonadion, Polymyxin b, Pralidoxim, Prilocain, Procainamit, Procain, Prochiorperazin, Progesteon, Propranolol, Pyridostigmin hydroxit, Pyridoxin, Quinidin, Quinupristin, globulin miễn dịch bệnh dại, vacxin phòng bệnh dại, Ranitidin, Remifentanil, Riboflavin, Rifampin, vacxin Ropi, Samarium, Scopolamin, Selenium, Sermorelin, Sincalit, Somatrem, Spectinomyxin, Streptokinaza, Streptomyxin, Succinylcholin, Sufentanil, Sulfamethoxazol, Tacrolirnus, Terbutalin, Teriparatit, Testosteron, Tetanus chống độc, Tetracain, Tetradecyl sulfat, Theophyllin, Thiamin, Thiethylperazin, Thiopental, hormon kích thích tuyến giáp, Tinzaparin, Tirofiban, Tobramyxin, Tolazolin, Tolbutamit, Torsemit, axit Tranexamic, Treprostinil, Trifluoperazin, Trimethobenzamit, Trimethoprim, Tromethamin, Tuberculin, vacxin phòng bệnh thương hàn, Urofollitropin, Urokinaza, axit Vaiproic, Vasopressin, Vecuroni, Verapamil, Voriconazol, Warfarin, vacxin phòng Bệnh sốt vàng da, Zidovudin, Kẽm, Ziprasidon hydrochiorit, Aclacinomyxin, Actinomyxin, Adriamyxin, AzaSerin, 6-Azauridin, Carzinophilin, Chromomyxin, Denopterin, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleuxin, Enocitabin, Loxuridin, Olivomyxin, Pirarubicin, Piritrexim, Pteropterin, Tagafur, Tubercidin, Alteplaza, Arcitumomab, bevacizumab, độc tố Botulinum Loại A, Botulinum độc tố Loại B, Capromab Pendetit, Daclizumab, Dornaza alfa, Drotrecogin alfa, Imciromab Pentetat, và Iodin-131.

Cụ thể, chất trị liệu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, globulin miễn dịch, Interferon beta, Interferon alpha-2a, Interferon alpha-1, Interferon alpha-n3, Interferon beta-1, Interferon beta-1a, Interferon gama-lb, Peg-interferon alpha-2 và Peginterferon alpha-2b, insulin, bisphosphat (ví dụ Pamidronat hoặc Zoledronat), Docetaxel, Doxorubincin, Doxorubicin liposom và bevacizumab.

2. Sử dụng để loại bỏ glycosaminoglycanaza dư

Sáng chế còn mô tả các phương pháp để điều trị bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan bằng cách sử dụng chế phẩm chứa PH20 tan được, thường là hyaluronidaza tan được một mình hoặc cùng với hoặc có bổ sung các điều trị và/hoặc chất khác. Tình trạng bệnh và bệnh có liên quan đến hyaluronan là bệnh và tình trạng bệnh trong đó mức hyaluronan cao do nguyên nhân, hậu quả của bệnh hoặc tình trạng bệnh này hoặc được quan sát thấy ở bệnh hoặc tình trạng bệnh này, và có thể được điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm hyaluronidaza, như PH20 tan được, một mình hoặc cùng với có bổ sung các điều trị và/hoặc chất khác.

Thông thường, bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan là có liên quan đến sự biểu hiện hyaluronan cao ở mô, tế bào, hoặc dịch lỏng của cơ thể (ví dụ mô khối u hoặc mô có liên quan đến khối u, máu, hoặc khoang kẽ) so với đối chứng, ví dụ mô, tế bào hoặc dịch lỏng của cơ thể khác. Sự biểu hiện hyaluronan cao có thể là cao so với mô, tế bào hoặc dịch lỏng của cơ thể thông thường, ví dụ, mô, tế bào hoặc dịch lỏng của cơ thể mà tương tự với mẫu được thử nghiệm, nhưng được phân lập từ đối tượng khác, như đối tượng bình thường (tức là không có bệnh hoặc tình trạng bệnh, hoặc không có loại bệnh hoặc tình trạng bệnh mà đối tượng đang thử nghiệm có), ví dụ, đối tượng không có bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan. Sự biểu hiện hyaluronan cao có thể là cao so với mô tương tự từ đối tượng khác có bệnh hoặc tình trạng bệnh tương tự, nhưng bệnh của họ không nghiêm trọng như và/hoặc không có liên quan đến hyaluronan hoặc biểu hiện hyaluronan tương đối ít hơn và do đó có liên quan đến hyaluronan ở mức thấp hơn. Ví dụ, đối tượng được thử nghiệm có thể là đối tượng mắc ung thư có liên quan đến hyaluronan, trong đó lượng HA trong mô, tế bào hoặc dịch lỏng là tương đối cao so với đối tượng mắc ung thư ít nghiêm trọng hơn, như ung thư giai đoạn sớm, ung thư được biệt hóa hoặc loại ung thư khác. Trong ví dụ khác, tế bào, mô hoặc dịch lỏng chứa mức hyaluronan tăng so với mẫu đối chứng, như dịch lỏng, mô, dịch chiết (ví dụ dịch chiết tế bào hoặc nhân), chế phẩm axit nucleic hoặc peptit, dòng tế bào, sinh thiết, mẫu chuẩn hoặc các mẫu khác, với lượng đã biết hoặc lượng tương đối của HA, như mẫu, ví dụ dòng tế bào khối u, được biết là biểu hiện mức HA tương đối thấp, như dòng tế bào khối u nêu làm ví dụ được nêu trong bản mô tả này mà biểu hiện mức HA thấp, ví dụ, dòng tế bào HCT 116, dòng tế bào HT29, dòng tế bào NCI H460, dòng tế

bào DU145, dòng tế bào Capan-1, và khối u từ mô hình thử nghiệm khối u được tạo ra bằng cách sử dụng dòng tế bào này.

Trong một số trường hợp, bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan là có liên quan đến áp suất dịch lỏng trong kẽ tăng, thể tích mạch giảm, và/hoặc hàm lượng nước trong mô tăng, như khối u. Trong một ví dụ, việc điều trị bằng chế phẩm và hợp chất được đề xuất trong bản mô tả này làm cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng này hoặc các triệu chứng khác có liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh, ví dụ, cải thiện sự tồn tại hoặc chất lượng cuộc sống của đối tượng theo thời gian, hoặc ức chế sự phát triển của khối u.

Bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan nêu làm ví dụ mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng enzym, chế phẩm và phương pháp được đề xuất, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư giàu hyaluronan, ví dụ, khối u, bao gồm các khối u rắn như ung thư giai đoạn muộn, ung thư di căn, ung thư không phân biệt được, ung thư buồng trứng, ung thư biểu môtại chỗ (ISC), ung thư biểu mô tế bào có vảy (SCC), ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tụy, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư vú, ung thư ruột kết và các bệnh ung thư khác.

Ngoài ra, ví dụ về các bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan là bệnh mà có liên quan đến áp suất chất lỏng trong kẽ cao, như bệnh có liên quan đến áp suất đĩa đệm, và bệnh phù, ví dụ, bệnh phù do cấy ghép cơ quan, đột quỵ, chấn thương não hoặc các tổn thương khác gây ra. Bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan nêu làm ví dụ bao gồm bệnh và tình trạng bệnh có liên quan đến áp suất chất lỏng trong kẽ cao, thể tích mạch giảm, và/hoặc hàm lượng nước trong mô tăng, bao gồm ung thư, áp suất đĩa đệm và bệnh phù. Trong một ví dụ, việc điều trị tình trạng bệnh, bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến hyaluronan bao gồm việc làm thuyên giảm, làm giảm, hoặc các tác dụng có lợi khác đến một hoặc nhiều trong số áp suất dịch lỏng trong kẽ tăng (IFP), thể tích mạch giảm, và hàm lượng nước trong mô tăng.

Thông thường, bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến hyaluronan có liên quan đến sự biển hiện HA tăng, ví dụ, trong mô bị bệnh, ví dụ, khối u. Trong một ví dụ, HALO (vùng chất nền quanh tế bào giàu proteoglycan, bao gồm hyaluronan) tạo thành ở mô của đối tượng, ví dụ, trong mô bị bệnh. Trong ví dụ khác, sự có mặt của HALO được phát hiện trong mô nuôi cấy tế bào in vitro từ mô của đối tượng, ví dụ, mô bị bệnh.

a. Sử dụng trong điều trị ung thư

Hyaluronidaza có tác dụng chống chất sinh ung thư trực tiếp do làm phân hủy axit hyaluronic trong khối u. Như vậy, hyaluronidaza PH20 tan được, như esPH20, có thể được sử dụng để điều trị khối u, cụ thể là, khối u giàu hyaluronan. Ung thư giàu hyaluronan có thể là ung thư trong đó tế bào ung thư sản xuất HALO, ung thư có sự biểu hiện cao của hyaluronan (như được xác định bằng cách nhuộm màu miễn dịch, ví dụ nhuộm màu mô phần cắt ra từ khối u), ung thư có HAS2 cao (Hyaluronan syntaza 2), ung thư không sản xuất hyaluronidaza (HYAL1) *in vitro*. Ung thư giàu hyaluronan có thể được nhận dạng bằng phương pháp bất kỳ để đánh giá sự biểu hiện của hyaluronan, và các phương pháp đã biết khác để thử nghiệm sự biểu hiện protein/mARN.

Một số ung thư giàu hyaluronan được nhận diện. Trong một số trường hợp, sự biểu hiện hyaluronan có liên quan đến sự chẩn đoán bệnh kém, ví dụ, tỷ lệ sống sót và/hoặc tỷ lệ sống sót không phát lại bệnh giảm, di căn, sự hình thành mạch, sự xâm lấn của tế bào ung thư vào các mô/khu vực khác, và các dấu hiệu khác của sự chẩn đoán bệnh kém. Sự liên quan này được quan sát, ví dụ, ở khối u giàu hyaluronan bao gồm ung thư buồng trứng, SCC, ISC, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư phổi, bao gồm ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), ung thư vú, ung thư ruột kết và ung thư tụy (xem, ví dụ, Maarit et al., *Cancer Research*, 60:150-155 (2000); Karvinen et al., *British Journal of Dermatology*, 148:86-94 (2003); Lipponen et al., *Eur. Journal of Cancer*, 849-856 (2001); Pirinen et al., *Int. J. Cancer*: 95: 12-17 (2001); Auvinen et al., *American Journal of Pathology*, 156(2):529-536 (2000); Ropponen et al., *Cancer Research*, 58: 342-347 (1998)). Như vậy, ung thư giàu hyaluronan có thể được điều trị bằng cách sử dụng hyaluronidaza, như PH20 tan được, để điều trị một hoặc nhiều triệu chứng của ung thư. Khối u giàu hyaluronan bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, khối u tuyến tiền liệt, vú, ruột kết, buồng trứng, dạ dày, đầu và cổ và các khối u và ung thư khác.

Hyaluronidaza cũng có thể được sử dụng để làm tăng độ nhạy của khối u có khả năng kháng phương pháp hóa trị liệu thông thường. Ví dụ, hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng cho bệnh nhân có khối u có liên quan đến việc thiếu HYAL1 với lượng hữu hiệu để làm tăng sự khuếch tán xung quanh vị trí khối u (ví dụ, để thúc đẩy sự tuần hoàn và/hoặc nồng độ của chất hóa trị liệu trong và xung quanh vị trí khối u), ức chế sự di động của tế bào khối u, như bằng cách phân hủy axit hyaluronic, và/hoặc

làm giảm ngưỡng gây chết tế bào theo chương trình của tế bào khối u. Điều này có thể đưa (các) tế bào khối u đến trạng thái chết tế bào theo chương trình (anoikis), mà làm cho tế bào khối u nhạy cảm hơn với tác động của chất hóa trị liệu. Việc sử dụng hyaluronidaza có thể gây ra sự đáp ứng của khối u kháng phương pháp hóa trị liệu trước đây của tuyến tụy, dạ dày, ruột kết, buồng trứng, và vú (Baumgartner et al. (1988) *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker et al. (1986) *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390). Như vậy, ngoài việc điều trị ung thư bằng một mình PH20 tan được, chế phẩm và các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để điều trị ung thư có liên quan đến hyaluronan bằng cách sử dụng PH20 tan được cùng với, ví dụ, đồng thời hoặc trước khi sử dụng chất hóa trị liệu hoặc chất chống ung thư hoặc phép điều trị khác. Trong ví dụ này, hyaluronidaza, như PH20 tan được, thường tăng cường tính thấm của chất hóa trị liệu hoặc chất chống ung thư khác vào các khối u rắn, nhờ đó điều trị bệnh.

Chế phẩm chứa PH20 tan được có thể được tiêm vào trong khối u với chất chống ung thư hoặc được tiêm qua đường tĩnh mạch đối với ung thư rải rác hoặc khó đến được khối u. Chất chống ung thư có thể là chất hóa trị liệu, kháng thể, peptit, hoặc vectơ liệu pháp gen, virut hoặc ADN. Ngoài ra, hyaluronidaza có thể được sử dụng để tuyển tế bào khối u vào bể tuần hoàn để làm nhạy các khối u khó chữa bằng hóa trị liệu trước đây mà đã đạt được khả năng kháng nhiều loại thuốc (St Croix et al., (1998) *Cancer Lett* September 131(1): 35-44).

Chất chống ung thư nêu làm ví dụ mà có thể được sử dụng sau, cùng lúc với hoặc trước khi sử dụng PH20 tan được, như esPH20, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở Acivicin; Aclarubicin; Acodazol; Acronin; Adozelesin; Aldesleukin; Alemtuzumab; Alitretinoin (Axit 9-Cis-Retinoic); Allopurinol; Altretamin; Alvocidib; Ambazon; Ambomyxin; Ametantron; Amifostin; Aminoglutethimit; Amsacrin; Anastrozol; Anaxiron; Ancitabin; Anthramyxin; Apaziquon; Argimesna; Arsenic Trioxit; Asparaginaza; Asperlin; Atrimustin; Azacitidin; Azetepa; Azotomyxin; Banoxantron; Batabulin; Batimastat; BCG sống; Benaxibin; Bendamustin; Benzodepa; Bexaroten; Bevacizumab; Bicalutamit; Bietaserpin; Biricodar; Bisantren; Bisantren; Bisnafit Dimesylat; Bizelesin; Bleomyxin; Bortezomib; Brequinar; Bropirimin; Budotitan; Busulfan; Cactinomyxin; Calusteron; Canertinib; Capecitabin; Caracemit; Carbetimer; Carboplatin; Carboquon; Carmofur; Carmustin với Polifeprosan; Carmustin; Carubicin;

Carzelesin; Cedefingol; Celecoxib; Cemadotin; Chlorambucil; Cioteronel; Cirolemyxin; Cisplatin; Cladribin; Clanfenur; Clofarabin; Crisnatol; Xyclophosphamit; Xytarabin liposom; Xytarabin; Dacarbazin; Dactinomyxin; Darbepoetin Alfa; Daunorubicin liposom; Daunorubicin/Daunomyxin; Daunorubicin; Decitabin; Denileukin Diftitox; Dexniguldipin; Dexonnaplatin; Dexrazoxan; Dezaguanin; Diaziquon; Dibrospidium; Dienogest; Dinalin; Disermolit; Docetaxel; Dofequidar; Doxifluridin; Doxorubicin liposom; Doxorubicin HCL; Docorubicin HCL liposom tiêm; Doxorubicin; Droloxifen; Dromostanolon Propionat; Duazomyxin; Ecomustin; Edatrexat; Edotecarin; Eflornithin; Elacridar; Elinafid; Dung dịch Elliott's B; Elsamitrucin; Emitefur; Enloplatin; Enpromat; Enzastaurin; Epipropidin; Epirubicin; Epoetin alfa; Eptaloprost; Erbulozol; Esorubicin; Estramustin; Etanidazol; Etoglucid; Etoposit phosphat; Etoposit VP-16; Etoposit; Etoprin; Exemestan; Exisulind; Fadrozol; Fazarabin; Fenretinit; Filgrastim; Floxuridin; Fludarabin; Flouraxil; 5-flouraxil; Floxymesteon; Flurocitabin; Fosquidon; Fostriecin; Fostriecin; Fotretamin; Fulvestrant; Galarubicin; Galocitabin; Gemcitabin; Gemtuzumab/Ozogamicin; Geroquinol; Gimatecan; Gimeracil; Gloxazon; Glufosfamit; Goserelin axetat; Hydroxyure; Ibritumomab/Tiuxetan; Idarubicin; Ifosfamit; Ilmofosin; Ilomastat; Imatinib mesylat; Imexon; Improsulfan; Indisulam; Inproquon; Interferon alfa-2a; Interferon alfa-2b; Interferon Alfa; Interferon Beta; Interferon Gama; Interferon; Interleukin-2 và các Interleukin khác (bao gồm Interleukin tái tổ hợp); Intoplixin; Iobenguan [131-I]; Iproplatin; Irinotecan; Irsogladin; Ixabepilon; Ketotrexat; L-Alanosin; Lanreotit; Lapatinib; Ledoxantron; Letrozol; Leucovorin; Leuprolit; Leuprorelin (Leuprorelit); Levamisol; Lexacalcitol; Liarozol; Lobaplatin; Lometrexol; Lomustin/CCNU; Lomustin; Lonafarnib; Losoxantron; Lurtotecan; Mafosfamit; Mannosulfan; Marimastat; Masoprocol; Maytansin; Mechlorethamin; Mechlorethamin/Mù tạc nitơ; Megestrol axetat; Megestrol; Melengestrol; Melphalan; Melphalan; L-PAM; Menogaril; Mepitiostan; Mercaptopurin; 6-Mecaptopurin; Mesna; Metesind; Methotrexat; Methoxsalen; Metomidat; Metoprin; Meturedepa; Miboplatin; Miproxifen; Misonidazol; Mitindomit; Mitocarcin; Mitocromin; Mitoflaxon; Mitogillin; Mitoguazon; Mitomalcin; Mitomyxin C; Mitomyxin; Mitonafit; Mitoquidon; Mitosper; Mitotan; Mitoxantron; Mitozolomit; Mivobulin; Mizoribin; Mofaroten; Mopidamol; Mubritinib; Axit Mycophenolic; Nandrolon Phenpropionat; Nedaplatin; Nelzarabin; Nemorubicin; Nitracrin; Nocodazol; Nofetumomab; Nogalamyxin; Nolatrexed;

Nortopixantron; Octreotit; Oprelvekin; Ormaplatin; Ortataxel; Oteracil; Oxaliplatin; Oxisuran; Oxophenarsin; Paclitaxel; Pamidronat; Patubilon; Pegademaza; Pegaspargaza; Pegfilgrastim; Peldesin; Peliomyxin; Pelitrexol; Pemetrexed; Pentamustin; Pentostatin; Peplomyxin; Perfosfamit; Perifosin; Picoplatin; Pinafit; Pipobroman; Piposulfan; Pirfenidon; Piroxantron; Pixantron; Plevitrexed; Plicamycid Mithramyxin; Plicamyxin; Plomestan; Plomestan; Porfimer natri; Porfimer; Porfiromyxin; Prednimustin; Procarbazin; Propamidin; Prospidium; Pumitepa; Puromyxin; Pyrazofurin; Quinacrin; Ranimustin; Rasburicaza; Riboprin; Ritrosulfan; Rituximab; Rogletimit; Roquinimex; Rufocromomyxin; Sabarubicin; Safingol; Sargramostim; Satraplatin; Sebriplatin; Semustin; Simtrazen; Sizofiran; Sobuzoxan; Sorafenib; Sparfosat; Axit Sparfosic; Sparsomyxin; Spirogermanium; Spiromustin; Spiroplatin; Spiroplatin; Squalamin; Streptonigrin; Streptovarycin; Streptozocin; Sufosfamit; Sulofenur; Sunitinib Malat; 6-TG; Tacedinalin; đá tal; Talisomyxin; Tallimustin; Tamoxifen; Tariquidar; Tauromustin; Tecogalan; Tegafur; Teloxantron; Temoporfin; Temozolomit; teniposit/VM-26; teniposit; Teroxiron; Testolacton; Thiamiprin; Thioguanin; Thiotepa; Tiamiprin; Tiazofurin; Tilomisol; Tiloron; Timcodar; Timonacic; Tirapazamin; Topixantron; Topotecan; Toremifen; Tositumomab; Trabectedin (Ecteinascidin 743); Trastuzumab; Trestolon; Tretinoin/ATRA; Triciribin; Trilostan; Trimetrexat; Triplatin Tetranitrat; Triptorelin; Trofosfamit; Tubulozol; Ubenimex; Uraxil Mù tạc; Uredepa; Valrubicin; Valspodar; Vapreotit; Verteporfin; Vinblastin; Vincristin; Vindesin; Vinepidin; Vinflunin; Vinformit; Vinglycinat; Vinleucinol; Vinleurosin; Vinorelbin; Vinrosidin; Vintriptol; Vinzolidin; Vorozol; Xanthomyxin A (Guamexyclin); Zeniplatin; Zilascorb [2-H]; Zinostatin; Zoledronat; Zorubicin; và Zosuquidar, ví dụ:

Aldesleukin (ví dụ PROLEUKIN®); Alemtuzumab (ví dụ CAMPATH®); Alitretinoin (ví dụ PANRETIN®); Allopurinol (ví dụ ZYLOPRIM®); Altretamin (ví dụ HEXALEN®); Amifostin (ví dụ ETHYOL®); Anastrozol (ví dụ ARIMIDEX®); Arsenic Trioxit (ví dụ TRISENOX®); Asparaginaza (ví dụ ELSPAR®); BCG sống (ví dụ TICE® BCG); Bexaroten (ví dụ TARGRETIN®); Bevacizumab (AVASTIN®); Bleomyxin (ví dụ BLENOXANE®); Busulfan trong tĩnh mạch (ví dụ BUSULFEX®); Busulfan đường miệng (ví dụ MYLERAN™); Calusteron (ví dụ METHOSARB®); Capecitabin (ví dụ XELODA®); Carboplatin (ví dụ PARAPLATIN®); Carmustin (ví dụ

BCNU®, BiCNU®); Carmustin với Polifeprosan(ví dụ GLIADEL® Wafer); Celecoxib (ví dụ CELEBREX®); Chlorambucil (ví dụ LEUKERAN®); Cisplatin (ví dụ PLATINOL®); Cladribin (ví dụ LEUSTATIN®, 2-CdAđ); Xyclophosphamit (ví dụ CYTOXAN®, NEOSAR®); Xytarabin (ví dụ CYTOSAR-U®); Xytarabin liposom (ví dụ DepoCyt®); Dacarbazin (ví dụ DTIC-Domeừ): Dactinomyxin (ví dụ COSMEGEN®); Darbepoetin Alfa (ví dụ ARANESP®); Daunorubicin liposom (ví dụ DAUOXOME®); Daunorubicin/Daunomyxin (ví dụ CERUBIDINE®); Denileukin Diftitox (ví dụ ONTAK®); Dexrazoxan (ví dụ ZINECARD®); Docetaxel (ví dụ TAXOTERE®); Doxorubicin (ví dụ ADRIAMYXIN®, RUBEX®); Doxorubicin liposom, bao gồm dung dịch tiêm Docorubicin HCL liposom (ví dụ DOXIL®); Dromostanolon propionat (ví dụ DROMOSTANOLONE® và MASTERONE® Injection); Dung dịch Elliott's B(ví dụ Elliott's B Solution®); Epirubicin (ví dụ ELLENCE®); Epoetin alfa (ví dụ EPOGEN®); Estramustin (ví dụ EMCYT®); Etoposit phosphat (ví dụ ETOPOPHOS®); Etoposit VP-16 (ví dụ VEPESID®); Exemestan (ví dụ AROMASIN®); Filgrastim (ví dụ NEUPOGEN®); Floxuridin (ví dụ FUDR®); Fludarabin (ví dụ FLUDARA®); Flouraxil incl. 5-FU (ví dụ ADRUCIL®); Fulvestrant (ví dụ FASLODEX®); Gemcitabin (ví dụ GEMZAR®); Gemtuzumab/Ozogamicin (ví dụ MYLOTARG®); Goserelin axetat (ví dụ ZOLADEX®); Hydroxyure (ví dụ HYDREA®); Ibritumomab/Tiuxetan (ví dụ ZEVALIN®); Idarubicin (ví dụ IDAMYXIN®); Ifosfamit (ví dụ IFEX®); Imatinib mesylat (ví dụ GLEEVEC®); Interferon alfa-2a (ví dụ ROFERON-A®); Interferon alfa-2b (ví dụ INTRON A®); Irinotecan (ví dụ CAMPTOSAR®); Letrozol (ví dụ FEMARA®); Leucovorin (ví dụ WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); Levamisol (ví dụ ERGAMISOL®); Lomustin/CCNU (ví dụ CeeBU®); Mechlorethamin/Mù tạc nitơ (ví dụ MUSTARGEN®); Megestrol axetat (ví dụ MEGACE®); Melphalan/L-PAM (ví dụ ALKERAN®); Mercaptopurin incl. 6-MP (ví dụ PURINETHOL®); Mesna (ví dụ MESNEX®); Methotrexat; Methoxsalen (ví dụ UVADEX®); Mitomyxin C (ví dụ MUTAMYXIN®, MITOZYTREX®); Mitotan (ví dụ LYSODREN®); Mitoxantron (ví dụ NOVANTRONE®); Nandrolon Phenpropionat (ví dụ DURABOLIN-50®); Nofetumomab (ví dụ VERLUMA®); Oprelvekin (ví dụ NEUMEGA®); Oxaliplatin (ví

dụ ELOXATIN®); Paclitaxel (ví dụ PAXENE®, TAXOL®); Pamidronat (ví dụ AREDIA®); Pegademaza (ví dụ ADAGEN®); Pegaspargaza (ví dụ ONCASPAR®); Pegfilgrastim (ví dụ NEULASTA®); Pentostatin (ví dụ NIPENT®); Pipobroman (ví dụ VERCYTE®); Plicamyxin/Mithramyxin (ví dụ MITHRACIN®); Porfimer natri (ví dụ PHOTOFRIN®); Procarbazin (ví dụ MATULANE®); Quinacrin (ví dụ ATABRINE®); Rasburicaza (ví dụ ELITEK®); Rituximab (ví dụ RITUXAN®); Sargramostim (ví dụ PROKINE®); Streptozocin (ví dụ ZANOSAR®); Sunitinib Malat (ví dụ SUTENT®); đá tal (ví dụ SCLEROSOL®); Tamoxifen (ví dụ NOLVADEX®); Temozolomit (ví dụ TEMODAR®); teniposit/VM-26 (ví dụ VUMON®); Testolacton (ví dụ TESLAC®); Thioguanin incl. 6-TG; Thiotepa (ví dụ THIOPLEX®); Topotecan (ví dụ HYCAMTIN®); Toremifen (ví dụ FARESTON®); Tositumomab (ví dụ BEXXAR®); Trastuzumab (ví dụ HERCEPTIN®); Tretinoin/ATRA (ví dụ VESANOID®); Uraxil Mù tạc; Valrubicin (ví dụ VALSTAR®); Vinblastin (ví dụ VELBAN®); Vincristin (ví dụ ONCOVIN®); Vinorelbin (ví dụ NAVELBINE®); và Zoledronat (ví dụ ZOMETA®).

Trong một ví dụ, PH20 tan được, như esPH20, ví dụ, rHuPH20 được PEGyl hóa, được sử dụng cho đối tượng sau, cùng lúc với hoặc trước khi sử dụng một hoặc nhiều trong số docetaxel (ví dụ TAXOTERE®), Doxorubicin liposom (ví dụ DOXIL®), Sunitinib Malat (ví dụ SUTENT®) hoặc Bevacizumab (AVASTIN®).

Do đó, polypeptit PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị ung thư di căn và không di căn, bao gồm ung thư mà có hoạt tính hyaluronidaza nội sinh giảm so với tế bào không ung thư. Hyaluronidaza có thể được sử dụng làm chất hóa trị liệu một mình hoặc cùng với các chất hóa trị liệu khác. Ung thư nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ung thư biểu mô tế bào phổi nhỏ, ung thư biểu mô tế bào phổi hình vảy, và ung thư vú, buồng trứng, đầu và cổ, hoặc ung thư bất kỳ khác có liên quan đến mức suy yếu của hoạt tính hyaluronidaza hoặc sự dị hóa axit hyaluronic giảm.

b. Sử dụng trong điều trị tình trạng tích lũy glycosaminoglycan trong não

Mức axit hyaluronic tăng cao ở nhiều tình trạng bệnh lý ở não tủy. Mức axit hyaluronic ở não tủy thường ít hơn 200 µg/L ở người trưởng thành (Laurent et al. (1996) *Acta Neurol Scand September* 94(3):194-206), nhưng có thể tăng cao đến mức hơn 8000

μg/L ở các bệnh như viêm màng não, chứng hẹp xương sống, tổn thương ở đầu và chứng nhồi máu não. Hyaluronidaza, như, ví dụ, rHuPH20 tan được, có thể được sử dụng để phân hủy mức cơ chất cao một cách trầm trọng.

Việc thiếu các mạch bạch huyết có hiệu quả trong não cũng có thể dẫn đến bệnh phù đe dọa sự sống sau chấn thương ở đầu. Sự tích lũy axit hyaluronic là kết quả của việc tổng hợp tăng bởi syntaza axit hyaluronic và sự phân hủy giảm. Sự tích lũy axit hyaluronic ban đầu có thể có lợi cho mục đích tốt là làm tăng hàm lượng nước trong mô đã bị tổn hại để thúc đẩy sự thoát mạch của bạch cầu, nhưng sự tích lũy liên tục có thể dẫn đến tử vong. Việc sử dụng hyaluronidaza, như trong vỏ hoặc qua đường tĩnh mạch, cho bệnh nhân bị chấn thương ở đầu có thể có lợi để loại bỏ sự tích lũy axit hyaluronic ở mô và nước có liên quan đến nó.

PH20 tan được cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh phù có liên quan đến khối u não, đặc biệt là bệnh phù có liên quan đến nhiều dạng u nguyên bào xốp. Bệnh phù có liên quan đến khối u não gây ra do sự tích lũy của axit hyaluronic trong các phần không ung thư của não liền kề với khối u. Việc sử dụng hyaluronidaza PH20 tan được cho các vị trí tích lũy axit hyaluronic (ví dụ, bằng cách tiêm trong tĩnh mạch hoặc thông qua điện trở sun (shunt)) có thể làm thuyên giảm bệnh phù có liên quan đến các khối u ác tính này bằng cách phân hủy axit hyaluronic dư ở các vị trí này.

c. Sử dụng trong điều trị tình trạng tích lũy glycosaminoglycan ở bệnh tim mạch

Hyaluronidaza PH20 tan được có thể được sử dụng để điều trị một số bệnh tim mạch. Việc sử dụng hyaluronidaza trong mô hình thử nghiệm ở động vật sau chứng nhồi máu cơ tim thử nghiệm có thể làm giảm mức độ của chứng nhồi máu (Maclean, et al (1976) Science 194(4261):199-200). Một cơ chế được đề xuất mà theo cơ chế này, việc làm giảm có thể là do làm giảm sự tích lũy axit hyaluronic mà xuất hiện sau sự tái đẩy máu của chứng thiếu máu cục bộ. Việc làm giảm mức độ của chứng nhồi máu được tin là xảy ra do sự dẫn lưu bạch huyết tăng và sự oxy hóa mô tăng và làm giảm hàm lượng nước ở cơ tim.

Hyaluronidaza PH20 tan được cũng có thể được sử dụng để hạn chế các mảng hình vành từ bệnh xơ cứng động mạch. Các mảng này tích tũy glycosaminoglycan và

điều khiển đại thực bào và sự bám dính của tế bào bọt (Kolodgie et al. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(10):1642-8).

d. Sử dụng trong phẫu thuật cắt dịch kính và các tình trạng bệnh và rối loạn liên quan đến mắt

Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng để làm giảm thiểu sự tách rời hoặc sự xé rách võng mạc trong phẫu thuật cắt dịch kính. Điều này có thể làm cho, ví dụ, thể kính trở nên không liên hợp hoặc "không được dính" với võng mạc, trước khi loại bỏ thể kính. Sự không dính hoặc không liên hợp của thể kính có thể làm giảm thiểu khả năng xảy ra sự xé rách hoặc sự tách rời thêm nữa của võng mạc khi thể kính được loại bỏ.

Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác nhau về mắt, bao gồm ứng dụng phụ thuộc phẫu thuật cắt dịch kính được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,292,509. Việc sử dụng hyaluronidaza được tinh chế ở mức độ cao, như, ví dụ, PH20 tan được được đề xuất trong bản mô tả này, là thích hợp cho các quy trình trong mắt để làm giảm thiểu khả năng sinh miễn dịch và tính độc.

Hyaluronidaza PH20 tan được có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn ở mắt, ví dụ, bằng cách ngăn ngừa sự phân bố mạch mới và làm tăng tốc độ thanh thải khỏi thủy tinh thể của các chất độc với võng mạc. Hyaluronidaza PH20 tan được có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu để hóa lỏng thể kính của mắt mà không gây độc cho mắt. Sự hóa lỏng của thể kính làm tăng tốc độ trao đổi chất lỏng từ phòng dịch kính. Sự tăng tốc độ trao đổi này loại bỏ chất nhiễm tạp mà sự xuất hiện của nó có thể gây ra sự tổn hại cho mắt và võng mạc.

Hyaluronidaza PH20 tan được cũng có thể được sử dụng để làm giảm áp suất sau phẫu thuật. Axit hyaluronic được sử dụng trong mắt chủ yếu làm chất đệm trong quá trình phẫu thuật thủy tinh thể trong mắt và bệnh đục nhân mắt. Nó cũng được sử dụng trong các quá trình phẫu thuật mắt như phẫu thuật chữa chứng tăng nhãn áp, thủy tinh thể và võng mạc và trong cấy ghép màng sừng. Tác dụng phụ phổ biến xảy ra ở bệnh nhân bị đục nhân mắt sau khi phẫu thuật là sự tăng nhãn áp đáng kể lúc mới đầu, và thường kéo dài. Tình trạng bệnh này đôi khi nghiêm trọng, đặc biệt là ở bệnh nhân có sự thay đổi đĩa mắt do chứng tăng nhãn áp. Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được đồng sử

dụng với axit hyaluronic cho mắt trước khi phẫu thuật để làm giảm nhãn áp sau khi phẫu thuật. Hyaluronidaza được sử dụng với lượng hữu hiệu để làm giảm nhãn áp đến mức trước khi phẫu thuật bằng cách phá vỡ axit hyaluronic mà không làm giảm hiệu quả của nó trong quá trình phẫu thuật cũng không gây ra các tác dụng phụ ở bệnh nhân (patent Mỹ số 6,745,776).

Hyaluronidaza PH20 tan được cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân mắc chứng tăng nhãn áp để loại bỏ glycosaminoglycan ra khỏi mạng bó dây làm giảm nhãn áp, và có thể được áp dụng cho thủy tinh thể để xúc tiến quá trình phân giải sự xuất huyết của thủy tinh thể (tức là sự thoát mạch của máu vào thủy tinh thể), mà có thể xuất hiện có liên quan đến tình trạng bệnh như bệnh võng mạc tiểu đường, sự phân bố mạch mới trong võng mạc, sự tắc mạch võng mạc, sự tách rời thủy tinh thể xảy ra sau, sự xé rách võng mạc, chấn thương mắt và các tình trạng bệnh tương tự. Sự có mặt của sự xuất huyết của thủy tinh thể, mà thường phân giải chậm, có thể làm chậm, làm phức tạp hoặc ngăn ngừa quá trình mà đòi hỏi võng mạc được nhìn thấy thông qua thủy tinh thể để chẩn đoán và/hoặc để điều trị các quá trình như quá trình ngưng kết quang học bằng laze và các quá trình tương tự mà thường là các điều trị chủ yếu cho các tình trạng bệnh như bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh.

e. Sử dụng trong truyền dịch dưới da

Truyền dịch dưới da, truyền chất lỏng và chất điện giải vào lớp dưới da của da, là kỹ thuật hydrat hóa hữu ích và đơn giản thích hợp cho các bệnh nhân trưởng thành bị mất nước ở mức độ nhẹ đến vừa phải, đặc biệt là người cao tuổi. Mặc dù được xem là an toàn và hiệu quả, tác động bất lợi thường xuyên nhất là bệnh phù nhẹ dưới da mà có thể được điều trị bằng cách xoa bóp cục bộ hoặc chất lợi tiểu hệ thống. Khoảng 3 L có thể được cung cấp trong khoảng 24 giờ ở hai vị trí riêng rẽ. Vị trí truyền phổ biến bao gồm ngực, bụng, bắp đùi và cánh tay phía trên. Dung dịch được sử dụng trong việc truyền dịch dưới da bao gồm, ví dụ, nước muối sinh lý, nước muối bán sinh lý, glucoza với nước muối và 5% glucoza. Kali clorua cũng có thể được bổ sung vào dung dịch. Việc bổ sung hyaluronidaza, như PH20 tan được, vào dung dịch có thể tăng cường sự hấp thụ chất lỏng và làm tăng tổng tỷ lệ sử dụng.

f. Sử dụng trong liệu pháp gen

Công hiệu của hầu hết các vật truyền phân phối gen *in vivo* không tương ứng với công hiệu được quan sát thấy *in vitro*. Glycosaminoglycan có thể gây cản trở cho việc chuyển và khuếch tán của ADN và vectơ virut vào nhiều loại tế bào. Mức độ của các nguyên liệu chất nền ngoại bào có thể gây cản trở quy trình một cách đáng kể. Việc sử dụng hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể mở các kênh trong chất nền ngoại bào, do đó làm tăng sự phân phối của phép liệu pháp gen. Ví dụ, PH20 tan được có thể được sử dụng cùng với colagenaza để thúc đẩy sự truyền tính trạng của ADN *in vivo* (Dubensky et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81(23):7529-33). Hyaluronidaza cũng có thể tăng cường sự liệu pháp gen sử dụng virut có liên quan đến adeno (Favre et al, (2000) *Gene Therapy* 7(16):1417-20). Các kênh được mở sau khi sử dụng hyaluronidaza có kích thước sao cho thường tăng cường sự khuếch tán của các phân tử nhỏ hơn như retrovirut, adenovirut, virut có liên quan đến adeno và phức hợp ADN (cũng như các chất trị liệu và các chất dùng trong dược phẩm khác được quan tâm). Tuy nhiên, các lỗ này không lớn để xúc tiến sự chuyển chỗ và di chuyển của tế bào.

Trong một số ví dụ, các virut có thể được thao tác để biểu hiện hyaluronidaza, như PH20 tan được, để thúc đẩy sự sao chép và phân bố của chúng trong mô đích. Mô đích có thể là, ví dụ, mô ung thư nhờ đó virut có khả năng sao chép chọn lọc trong khối u. Virut cũng có thể là virut không gây tan trong đó virut sao chép một cách chọn lọc dưới trình tự khởi động đặc hiệu mô. Khi các virut sao chép, việc đồng biểu hiện hyaluronidaza với gen virut có thể thúc đẩy sự phân bố của virut *in vivo*.

g. Sử dụng làm thẩm mỹ

Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng để loại bỏ glycosaminoglycan có liên quan trong việc tích lũy lớp mỡ tích tụ dưới da và để xúc tiến dòng mạch bạch huyết. Ví dụ, PH20 tan được có thể được sử dụng để điều trị lớp mỡ tích tụ dưới da. Hyaluronidaza có thể được sử dụng thông qua việc tiêm dưới da lặp lại, phân phối qua da dưới dạng thuốc mỡ hoặc kem hoặc thông qua việc sử dụng chế phẩm giải phóng chậm tiêm được để xúc tiến sự phân hủy liên tục của glycosaminoglycan và ngăn ngừa sự trở lại của chúng.

Hyaluronidaza, như PH20 tan được, cũng có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh như bệnh phù "da lợn" hoặc bệnh phù "vỏ cam". Hyaluronidaza có thể tác động đến sự khử polyme hóa của mạch mucopolysacarit dài mà có thể tích lũy trong hạ

bì và chịu trách nhiệm cho sự giữ nước liên kết và sự làm chậm, do sự nén mao dẫn, của sự khuếch tán của chất lỏng hữu cơ, mà loại bỏ chất thải trao đổi chất. Sự giữ nước và chất thải này có liên quan đến sự quá tải chất béo của tế bào mỡ, tạo thành bệnh phù "da lợn" hoặc bệnh phù "vỏ cam" cổ điển. Sự khử polyme hóa có thể cắt mạch dài của mucopolysacarit thành các mạch ngắn hơn, dẫn đến sự loại bỏ nước liên kết và chất thải và sự phục hồi tuần hoàn của tĩnh mạch và mạch bạch huyết, đẩy lên đến cực điểm sự biến mất của bệnh phù cục bộ.

h. Sử dụng trong cấy ghép cơ quan

Hàm lượng của axit hyaluronic trong cơ quan có thể tăng với chứng viêm. Hàm lượng của axit hyaluronic tăng được quan sát trong mô từ các cơ quan khác nhau được đặc trưng bởi tổn thương viêm-miễn dịch như chứng viêm túi phổi (Nettelbladt et al. (1991) *Am. Rev. Resp. Dis.* 139: 759-762) và nhồi máu cơ tim (Waldenstrom et al. (1991) *J. Clin. Invest.* 88(5): 1622-1628). Ví dụ khác bao gồm sự thải loại mảnh ghép sau khi cấy ghép thận (Hallgren et al. (1990) *J. Exp. Med.* 171: 2063-2076; Wells et al. (1990) *Transplantation* 50: 240-243), ruột nhỏ (Wallander et al. (1993) *Transplant. Int.* 6: 133-137) hoặc tim (Hallgren et al. (1990) *J Clin Invest* 85:668-673); hoặc chứng viêm cơ tim có nguồn gốc từ virut (Waldenstrom et al. (1993) *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 277-282). Sự xuất hiện bệnh phù kẽ có liên quan đến sự ghép cơ quan tạo thành vấn đề nghiêm trọng trong lĩnh vực phẫu thuật cấy ghép. Mô ghép với bệnh phù kẽ có thể phồng lên đến mức độ mà tạm thời bị mất chức năng. Trong một số ví dụ, sự trương phồng có thể gây ra sự phá vỡ thận, dẫn đến sự xuất huyết nghiêm trọng. Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng để phân hủy glycosaminoglycan được tích lũy trong cấy ghép cơ quan. Việc loại bỏ các glycosaminoglycan này sẽ xúc tiến việc loại bỏ nước khỏi mô ghép do đó làm tăng cường chức năng của cơ quan.

i. Sử dụng trong bệnh phổi

Mức axit hyaluronic trong dịch rửa phế quản phế nang (BAL) từ các cá thể bình thường thường thấp hơn 15 ng/ml. Mức axit hyaluronic ở vị trí BAL tăng một cách đáng kể trong các tình trạng bệnh suy hô hấp (Bjermer et al. (1987) *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6602):803-6). Axit hyaluronic trong phổi tăng có thể ngăn chặn sự khuếch tán oxy và trao đổi khí cũng như hoạt hóa đáp ứng của bạch cầu trung tính và đại thực bào. Chế phẩm được tinh chế của PH20 tan được, như chế phẩm bất kỳ được đề xuất trong bản mô

tả này, có thể được phân phối bằng cách phân phối trong phổi hoặc trong tĩnh mạch cho bệnh nhân biểu hiện mắc các tình trạng bệnh như vậy để làm giảm mức hyaluronan. Hyaluronidaza, như PH20 tan được, cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân mắc các biến chứng liên quan đến phổi khác mà có liên quan đến mức glycosaminoglycan cao hoặc để tăng cường sự phân phối của các phân tử được đồng phân phối khác đến phổi.

3. Các ứng dụng khác

Trong các ví dụ khác về ứng dụng trị liệu của nó, hyaluronidaza, như PH20 tan được bao gồm esPH20 được đề xuất trong bản mô tả này, có thể được sử dụng cho các mục đích như thuốc giải độc cho sự hoại tử cục bộ từ việc tiêm cận tĩnh mạch của chất gây hoại tử như vinka alkaloit (Few et al. (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.*12, 23-26), việc điều trị u nang hạch (Paul et al. (1997) *J Hand Surg.* 22 (2): 219-21) và việc điều trị sự hoại tử mô do không đủ tĩnh mạch (Elder et al. (1980) *Lancet* 648-649). PH20 tan được cũng có thể được sử dụng để điều trị u nang hạch (còn được gọi là u nang cổ tay áo, u nang Bible, hoặc u nang dây chằng ở lưng), là khối mô mềm phổ biến nhất của tay và là túi được nạp đầy chất lỏng có thể được cảm thấy dưới da.

Hyaluronidaza, như PH20 tan được, có thể được sử dụng để điều trị tổn thương tủy sống bằng cách phân hủy chondroitin sulfat proteoglycan (CSPG). Sau tổn thương tủy sống, sẹo thần kinh đệm chứa CSPG được sản xuất bởi tế bào dạng sao. CSPG đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự phát triển sợi trục. Ngoài ra, sự biểu hiện của CSPG được thấy là làm tăng sau tổn thương của hệ thần kinh trung ương (CNS). PH20 tan được cũng có thể được sử dụng để điều trị đĩa bị thoát vị trong quy trình được biết là quy trình hóa hòa tan nhân. Chondroitinaza ABC, enzym phân cắt cơ chất tương tự như hyaluronidaza, có thể gây ra sự giảm áp suất trong đĩa trong gai thắt lương. Có ba loại tổn thương đĩa. Đĩa bị nhô ra là đĩa mà còn nguyên vẹn nhưng phình lên. Đĩa bị đùn ra, sợi bọc đã bị rách và NP rỉ ra, nhưng vẫn được nối với đĩa. Trong đĩa bị ẩn, mảnh NP vỡ tuôn ra khỏi đĩa và chuyển động tự do trong ống tủy sống. Sự hóa hòa tan nhân thường có ảnh hưởng đến đĩa bị nhô ra và đĩa bị đùn ra, nhưng không ảnh hưởng đến tổn thương đĩa bị ẩn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I. Ví dụ

Ví dụ sau được bao gồm chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Tạo ra thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy của hyaluronidaza PH20 của người

Trong ví dụ này, nhiều thể đột biến mất đoạnđầu cùng carboxy của hyaluronidaza PH20 của người được tạo ra. Hyaluronidaza PH20 trưởng thành của người, hoặc phân tử bám dính tinh trùng 1 (SPAM1), chứa 474 axit amin trong khi thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy trưởng thành được tạo ra trong ví dụ này có chiều dài nằm trong khoảng từ 472 axit amin đến 415 axit amin.

Oligonucleotit ADN mã hóa thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy của hyaluronidaza PH20 của người được cắt cụt từ axit amin A507 đến axit amin K450 được tổng hợp theo quy trình tổng hợp ADN chuẩn. Trình tự ADN gốc là hyaluronidaza PH20 của người được tối ưu hóa codon, trình tự nucleotit của nó được nêu trong SEQ ID NO:2. Hyaluronidaza PH20 của người được tối ưu hóa codon này chứa trình tự tín hiệu globulin miễn dịch kappa (IgK) khác loại, được nêu trong SEQ ID NO:144. Ngoài ra, trình tự chứa vị trí giới hạn 5' NheI và 3' BamHI để cho phép tách dòng vào plasmit HZ24 (SEQ ID NO:140). Trình tự nucleotit thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được nêu trong SEQ ID NO:146-185 và 199-201. Trình tự ADN tổng hợp được cắt bằng enzym giới hạn NheI và BamHI và được tách dòng vào plasmit HZ24 được cắt tương tự để tạo ra plasmit SPAM1-HZ24 thể đột biến đối với mỗi dòng riêng rẽ.

Thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được nêu trong Bảng 3. Thể đột biến SPAM1 được nhận dạng bởi 4 axit amin ở đầu cùng C của protein. Ngoài ra, chiều dài, tính bằng axit amin, của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy tiền chất và trưởng thành cũng được nêu trong bảng này.

Bảng 3. Thể đột biến khuyết đầu cùng Carboxy hyaluronidaza PH20 của người.

Thể đột biến	Tiền chất (axit amin)	Tiền chất SEQ ID NO	Trưởng thành (axit amin)	Trưởng thành SEQ ID NO
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-FLII	503	5	468	57

SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69
SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71
SPAM1-EPQI	480	20	445	72
SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76
SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83
SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-DGVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

Ví dụ 2

Biểu hiện của thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người

Trong ví dụ này, thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được tạo ra trong Ví dụ 1 được biểu hiện trong tế bào CHO-S. Ngoài ra, rHuPH20 và PH20 được gắn thẻ His được biểu hiện trong mỗi trong số bốn chủng của thể đột biến CHO kháng lectin, bao gồm Lec1 (Số loại CRL-1735, ATCC), Lec2 (Số loại CRL-1736, ATCC), Lec8 (Số loại CRL-1737, ATCC) và Pro-5 (Số loại CRL-1781). Sự biểu hiện của PH20 trong tế bào đột biến Lec được bàn luận thêm trong Ví dụ 9 dưới đây.

A. Biểu hiện tạm thời trong tế bào CHO-S trong đĩa 6 giếng

Plasmit thể đột biến PH20-HZ24 được tạo ra trong Ví dụ 1 được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào CHO-S (thu được từ tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc CHO K1) sử dụng GeneJuice® (Novagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, tế bào CHO-S được sinh trưởng trong môi trường CD CHO được bổ sung L-glutamin. Trước khi chuyển nhiễm, tế bào CHO-S được cấy trong đĩa có 6 giếng, với khoảng $5x10^5$ tế bào cho mỗi giếng, và được sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sau đó, môi trường được loại bỏ và tế bào CHO-S được rửa hai lần bằng 1 mL môi trường không có huyết thanh. GeneJuice® được trộn với môi trường không có huyết thanh sau đó là bổ sung 2 µg ADN thể đột biến-HZ24. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 5-15 phút, hỗn hợp GeneJuice®/ADN được bổ sung từng giọt vào mỗi giếng riêng rẽ chứa tế bào CHO-S được rửa. Sau 4 giờ, môi trường được thay thế bằng 1 mL môi trường CD-CHO được bổ sung L-glutamin và tế bào được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sự biểu hiện, môi trường tế bào được thu hoạch một cách riêng rẽ.

B. Sự biểu hiện tạm thời trong tế bào CHO trong đĩa nuôi cấy tế bào 10 cm

Plasmit thể đột biến PH20-HZ24 được tạo ra trong Ví dụ 1 được chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào CHO-S sử dụng GeneJuice® (Novagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo cách khác, HZ24-PH20, (SEQ ID NO:108, mã hóa rHuPH20), PH20sHis, (SEQ ID NO:187, mã hóa PH20 được gắn thẻ his) và HZ24-mut(B/S) (SEQ ID NO:122, mã hóa PH20 được cắt cụt ở axit amin 482), được chuyển nhiễm tạm thời vào bốn chủng của thể đột biến CHO kháng lectin, bao gồm Lec1 (Số loại CRL-1735, ATCC), Lec2 (Số

loại CRL-1736, ATCC), Lec8 (Số loại CRL-1737, ATCC) và Pro-5 (Số loại CRL-1781), sử dụng GeneJuice® (Novagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tóm lại, tế bào CHO-S được duy trì trong môi trường CD-CHO được bổ sung 8 mM GlutaMax. Tế bào đột biến CHO kháng lectin được sinh trưởng trong Môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS. Trước khi chuyển nhiễm, tế bào CHO được cấy trong đĩa nuôi cấy tế bào 10 cm, với khoảng $3x10^6$ tế bào cho mỗi giếng và được sinh trưởng qua đêm trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sau đó, môi trường được loại bỏ và lớp đơn tế bào được rửa hai lần bằng 10 mL môi trường không có huyết thanh. 36 µL GeneJuice® được trộn với 1,2 mL DMEM và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau khi ủ, 12 µg ADN được bổ sung và được trộn nhẹ nhàng. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, hỗn hợp GeneJuice®ADN được bổ sung từng giọt lớp đơn tế bào CHO và đĩa nuôi cấy tế bào được lắc nhẹ để trộn. Đĩa này được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sau 4 giờ, môi trường được thay thế bằng 12 mL môi trường CD DG44 không có chất tẩy rửa được bổ sung Glutamax-1 và tế bào được ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sự biểu hiện, môi trường tế bào được thu hoạch một cách riêng rẽ.

Ví dụ 3

Khả năng hòa tan của thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người

Trong ví dụ này, sau khi biểu hiện tạm thời, như được nêu trong Ví dụ 2 trên đây, môi trường tế bào được thu hoạch một cách riêng rẽ và được phân tích về sự biểu hiện PH20 và độ hòa tan bởi phân tích thẩm tách western. Khả năng hòa tan của thể đột biến cắt cụt ở đầu cùng C được xác định bằng cách kiểm tra xem protein được biểu hiện có mặt trong môi trường sinh trưởng hoặc trong tế bào hay không. Thể đột biến khuyết đầu cùng C có chiều dài nằm trong khoảng từ 455 đến 472 axit amin, tương ứng với các SEQ ID NO:55-65 và 99-101, chứa các gốc axit amin từ neo GPI mà đóng vai trò gắn protein vào màng tế bào. Tế bào biểu hiện các thể đột biến này được xử lý bằng phosphoinositol-phospholipaza C (PI-PLC), mà phân cắt Neo GPI để cho phép giải phóng protein tan được vào môi trường, và sự có mặt của PH20 trong môi trường và tế bào thu được được xác định bằng phân tích thẩm tách western.

A. Phân tích thẩm tách western

Các mẫu không được khử được tiến hành trên gel 4-20% Tris-Glyxin và được chuyển vào màng PVDF sử dụng iBlot (Invitrogen). Đối với thẩm tách Western, IgG thỏ kháng PH20 (0,5 µg/mL) được sử dụng làm kháng thể sơ cấp và IgG dê kháng thỏ được liên hợp HRP (0,1 ng/mL, Cat# DC03L, EMD) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Bằng chứng về sự biểu hiện được xác định bằng băng ở khoảng 66 kDa, tương ứng với hyaluronidaza PH20 tái tổ hợp của người.

B. Xử lý PI-PLC

1. Sự biểu hiện tạm thời trong đĩa có 6 giếng

Sự biểu hiện của rHuPH20 trong tế bào CHO-S trong 72 giờ, như được nêu trong Ví dụ 2A trên đây, môi trường tế bào được thu hoạch một cách riêng rẽ. Tế bào được rửa bằng môi trường không có huyết thanh sau đó là bổ sung 2 mL môi trường không có huyết thanh cho mỗi giếng. PI-PLC (0,5 đơn vị/giếng) được bổ sung vào mỗi giếng và tế bào được ủ trong PI-PLC trong 2 giờ. Môi trường và tế bào thu được được phân tích bằng phân tích thẩm tách western như được nêu trên đây.

2. Sự biểu hiện tạm thời trong đĩa nuôi cấy mô 10 cm

Hai đĩa, mỗi đĩa chứa tế bào CHO-S biểu hiện rHuPH20, một đĩa được xử lý bằng PI-PLC và một đĩa không được xử lý bằng PI-PLC, được chuẩn bị cho mỗi thể đột biến đầu cùng C như được nêu trong Ví dụ 2B trên đây. Sự biểu hiện trong 48 giờ, đối với tế bào chưa được xử lý bằng PI-PLC, môi trường tế bào được thu hoạch một cách riêng rẽ. Môi trường được thu hoạch được xoay tròn, được cô đến thể tích 10 mL, và đệm được trao đổi thành PBS sử dụng thiết bị cô Amicon 30kD MWCO. Tế bào được rửa bằng PBS lạnh và được cạo và được tái tạo huyền phù trong 1,2 mL PBS với chất ức chế proteaza Set III (Số loại 539134, Calbiochem). Tế bào được tái tạo huyền phù được nghiền siêu âm nhanh để điều chế dịch chiết toàn tế bào. Đối với việc xử lý tế bào bằng PI-PLC, sự biểu hiện trong 48 giờ, môi trường chưa được xử lý được thu hoạch, như được nêu trên đây. Tế bào được rửa một lần bằng môi trường CD DG44 mới với Glutamax-1, và môi trường được thay thế bằng 12 mL môi trường CD DG44 mới không có chất tẩy rửa được bổ sung Glutamax-1 với 3,0 đơn vị PI-PLC cho mỗi đĩa, và tế bào được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5 % CO_2. Sau 2 giờ, môi trường PI-PLC và tế bào được thu hoạch một

cách riêng rẽ, như được nêu trên đây. Môi trường và tế bào chưa được xử lý thu được, và môi trường được xử lý bằng PI-PLC và tế bào, được phân tích bằng phân tích thẩm tách western như được nêu trên đây.

C. Kết quả

Các kết quả được mô tả trong Bảng 4 dưới đây. Bốn thể đột biến, ILFL (SEQ ID NO:58), SILF (SEQ ID NO:100), VSIL (SEQ ID NO:59) và IVSI (SEQ ID NO:101), thể hiện sự biểu hiện PH20 thấp. Phân tích thẩm tách western cho thấy thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người ngắn hơn F500 (SEQ ID NO:59-95 và 100-101) được biểu hiện trong môi trường, như được chứng tỏ bởi băng protein ở khoảng 66 kDa. Thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người với chiều dài từ L501 đến A507 (SEQ ID NO:55-58 và 99) được biểu hiện trong tế bào. Trong quá trình xử lý các tế bào này bằng PI-PLC, hyaluronidaza PH20 của người được giải phóng vào môi trường, như được chứng tỏ bởi băng protein ở khoảng 66 kDa. Việc xử lý tế bào từ thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người, tương ứng với SEQ ID NO:59-65 và 100-101, bằng PI-PLC không có ảnh hưởng vì các protein này ban đầu được biểu hiện vào trong môi trường.

Bảng 4. Sự biểu hiện của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người.

Thể đột biến	Trưởng thành (AA)	Sự biểu hiện protein	Được biểu hiện trong môi trường	Được biểu hiện trong môi trường sau khi bổ sung PI-PLC
SPAM1-VASL (SEQ ID NO:108)	474	Có	Không	Có
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	472	Có	Không	Có
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	470	Có	Không	Có
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	468	Có	Không	Có
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO:99)	467	Có	Không	Có
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	466	Yếu	Không	Có
SPAM1-SILF (SEQ ID NO:100)	465	Yếu	Yếu / Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	464	Yếu	Có	Ban đầu trong môi trường

SPAM1-IVSI (SEQ ID NO:101)	463	Yếu	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	462	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	460	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	458	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	456	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-STLS (SEQ ID NO:65)	455	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	454	Có	Có	Ban đầu trong môi trường
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	452	Có	Có	n/a
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO:67)	450	Có	Có	n/a
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO:68)	449	Có	Có	n/a
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO:69)	448	Có	Có	n/a
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO:70)	447	Có	Có	n/a
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO:71)	446	Có	Có	n/a
SPAM1-EPQI (SEQ ID NO:72)	445	Có	Có	n/a
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO:73)	444	Có	Có	n/a
SPAM1-TEEP (SEQ ID NO:74)	443	Có	Có	n/a
SPAM1-ETEE (SEQ ID NO:75)	442	Có	Có	n/a
SPAM1-METE (SEQ ID NO:76)	441	Có	Có	n/a
SPAM1-PMET (SEQ ID NO:77)	440	Có	Có	n/a
SPAM1-PPME (SEQ ID NO:78)	439	Có	Có	n/a
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO:79)	438	Có	Có	n/a
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO:80)	437	Có	Có	n/a
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO:81)	436	Có	Có	n/a
SPAM1-AFLK	435	Có	Có	n/a

(SEQ ID NO:82)				
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO:83)	434	Có	Có	n/a
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO:84)	433	Có	Có	n/a
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO:85)	432	Có	Có	n/a
SPAM1-VCID (SEQ ID NO:86)	431	Có	Có	n/a
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO:87)	430	Có	Có	n/a
SPAM1-DGVC (SEQ ID NO:88)	429	Có	Có	n/a
SPAM1-IADG (SEQ ID NO:89)	427	Có	Có	n/a
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO:90)	425	Có	Có	n/a
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO:91)	423	Có	Có	n/a
SPAM1-DAVD (SEQ ID NO:92)	421	Có	Có	n/a
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO:93)	419	Có	Có	n/a
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO:94)	417	Có	Có	n/a
SPAM1-ADVK (SEQ ID NO:95)	415	Có	Có	n/a

Ví dụ 4

Khả năng hòa tan của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người sử dụng thử nghiệm Triton® X-114

Trong ví dụ này, khả năng hòa tan của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm Triton® X-114. Trong thử nghiệm này, hyaluronidaza PH20 tan được sẽ phân bố vào pha nước của dung dịch Triton® X-114 được làm ấm đến nhiệt độ 37°C (cải biến như được nêu bởi Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7) trong khi hyaluronidaza PH20 bám màng sẽ phân bố vào pha giàu chất tẩy rửa.

Đối với mục đích này, 2% (theo thể tích) Triton® X-114trong PBS ở nhiệt độ 0°C được bổ sung vào 200 µL môi trường nuôi cấy mô hoặc dịch chiết tế bào, như được điều

chế trong Ví dụ 3B trên đây, và mẫu được ủ trên đá. Để tách riêng, mẫu được phủ trên 30 µL đệm sucroza (6% khối lượng/thể tích) chứa 0,06% Triton® X-114 ở nhiệt độ 4°C trong ống ly tâm. Mẫu được gia nhiệt đến nhiệt độ 37°C trong 3 phút để làm phân tách pha và được ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 4000g ở nhiệt độ phòng. Pha nước và pha chất tẩy rửa được lấy ra để phân tích SDS-PAGE và thẩm tách Western. IgG thỏ kháng PH20 (0,5 µg/mL) được sử dụng làm kháng thể sơ cấp và IgG dê kháng thỏ được liên hợp HRP (0,1 ng/mL, Cat# DC03L, EMD) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. PH20 chiều dài đầy đủ của người, mà phân bố mạnh vào pha chất tẩy rửa, được sử dụng làm đối chứng.

Kết quả về khả năng hòa tan của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy được thể hiện trong Bảng 5. Thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người dài bằng hoặc đến F500 (tiền chất SEQ ID NO:7-13 và 48-49 hoặc trưởng thành SEQ ID NO:59-65 và 100-101) phân bố vào pha nước và do vậy là tan được. Thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người dài hơn F500 (SEQ ID NO:55-58 và 99) phân bố vào pha chất tẩy rửa và không tan được. PH20 chiều dài đầy đủ cũng không tan được.

Bảng 5. Khả năng hòa tan của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người

Thể đột biến	SEQ ID NO	Trưởng thành (AA)	Tan được
SPAM1-VASL	108	474	Không
SPAM1-SSVA	55	472	Không
SPAM1-IISS	56	470	Không
SPAM1-FLII	57	468	Không
SPAM1-LFLI	99	467	Không
SPAM1-ILFL	58	466	Không
SPAM1-SILF	100	465	Có
SPAM1-VSIL	59	464	Có
SPAM1-IVSI	101	463	Có
SPAM1-FIVS	60	462	Có
SPAM1-TMFI	61	460	Có
SPAM1-SATM	62	458	Có
SPAM1-TLSA	63	456	Có
SPAM1-PSTL	64	454	Có
SPAM1-STLS	65	455	Có

Ví dụ 5

Hoạt tính hyaluronidaza của thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người

Trong ví dụ này, thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được kiểm tra về hoạt tính hyaluronidaza PH20 của chúng sử dụng thử nghiệm vi chuẩn độ với axit hyaluronic được biotin hóa (HA được biotin hóa hoặc bHA). Thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được kiểm tra về hoạt tính hyaluronidaza ở cả pH 7,4 và pH 5,5.

Tóm lại, đĩa 96 giếng 4xBHX được phủ HA được biotin hóa (1,1 MDa). Dịch nổi sau chuyển nhiễm 72 giờ từ tế bào được chuyển nhiễm với thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người được pha loãng trong đệm ở độ pH 7,4 hoặc pH 5,5 và được bổ sung vào các giếng riêng rẽ của đĩa này và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 90 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung guanidin HCl 4M. Các giếng được rửa 4 lần bằng nước muối được đệm phosphat với Tween20 (PBST) để loại bỏ HA được biotin hóa được cắt bất kỳ sau đó là bổ sung streptavidin-HRP trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng được rửa 4 lần bằng PBST và đĩa này được phát triển bằng TMB. Đĩa được đọc ở 450 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa ELISA. Hoạt tính hyaluronidaza (tính bằng Đơn vị/ml) được xác định bằng cách ngoại suy độ hấp thụ ở 450 nm được xác định với đường cong chuẩn tham chiếu hyaluronidaza. Hyaluronidaza PH20 chiều dài đầy đủ trưởng thành của người và tế bào CHO chưa được chuyển nhiễm được sử dụng làm đối chứng dương tính và âm tính.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 6 và 6A, dưới đây. Thể đột biến mất đoạn đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người ngắn hơn I430, tương ứng với SPAM1-GDVC đến SPAM1-ADVK (SEQ ID NO:88-95), là không có hoạt tính. Thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người kết thúc ở I498 (SEQ ID NO:101), L499 (SEQ ID NO:59), F500 (SEQ ID NO:100), L501 (SEQ ID NO:58) và I502 (SEQ ID NO:99) có hoạt tính ít phát hiện được do mức biểu hiện thấp. Tất cả các thể đột biến khuyết đầu cùng carboxy hyaluronidaza PH20 của người (SEQ ID NO:55-57 và 60-87) đều là hyaluronidaza hoạt tính ở cả pH 7,4 và pH 5,5.

Bảng 6. Hoạt tính hyaluronidaza				
Thể đột biến khuyết	Tiền chất (AA)	Trưởng thành (AA)	Hoạt tính ở pH 7,4 (Đơn vị/ml)	Hoạt tính ở pH 5,5 (Đơn vị/ml)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	507	472	1,4715	1,125
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	505	470	1,458	0,837
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	503	468	0,9405	0,6345
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	501	466	0,0405	0,0405
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	499	464	0,02025	0,045
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	497	462	0,1755	0,216
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	495	460	0,45	0,612
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	493	458	0,5715	0,7335
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	491	456	0,3645	0,5625
SPAM1-STLS (SEQ ID NO:65)	490	455	0,819	1,2375
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	489	454	1,557	1,089
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	487	452	1,017	0,9225
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO:67)	485	450	1,8765	1,74825
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO:68)	484	449	1,4985	1,26225
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO:69)	483	448	2,45025	2,3085
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO:70)	482	447	2,03175	1,647
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO:71)	481	446	1,818	1,701
SPAM1-EPQI (SEQ ID NO:72)	480	445	2,1825	1,6425
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO:73)	479	444	1,917	2,0745
SPAM1-TEEP (SEQ ID NO:74)	478	443	1,764	1,584
SPAM1-ETEE (SEQ ID NO:75)	477	442	2,088	2,0475
SPAM1-METE (SEQ ID NO:76)	476	441	1,332	1,278
SPAM1-PMET (SEQ ID NO:77)	475	440	2,223	2,0925

SPAM1-PPME (SEQ ID NO:78)	474	439	1,2105	1,341
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO:79)	473	438	0,8595	0,91575
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO:80)	472	437	0,5445	0,9
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO:81)	471	436	3,321	2,79
SPAM1-AFLK (SEQ ID NO:82)	470	435	3,204	2,925
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO:83)	469	434	2,3895	2,2365
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO:84)	468	433	0,5625	0,62775
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO:85)	467	432	0,5535	0,4725
SPAM1-VCID (SEQ ID NO:86)	466	431	0	0,2115
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO:87)	465	430	0,441	0,468
SPAM1-DGVC (SEQ ID NO:88)	464	429	0	0,045
SPAM1-IADG (SEQ ID NO:89)	462	427	0	0,00225
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO:90)	460	425	0	0,0135
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO:91)	458	423	0,0495	0,0585
SPAM1-DAVD (SEQ ID NO:92)	456	421	0	0,0675
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO:93)	454	419	0	0,054
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO:94)	452	417	0,054	0,0225
SPAM1-ADVK (SEQ ID NO:95)	450	415	0,063	0,0405
VASL (SEQ ID NO:108)	509	474	1,8045	0,891
VASL + PLC (SEQ ID NO:108)	509	474	3,96	2,313
HZ24-PH20 (SEQ ID NO:109)	482	447	0,499	0,726188
CHO-S	n/a	n/a	0	0,012375

Bảng 6A. Hoạt tính hyaluronidaza				
Thể đột biến khuyết	Tiền chất (AA)	Trưởng thành (AA)	Hoạt tính ở pH 7,4 (Đơn vị/ml)	Hoạt tính ở pH 5,5 (Đơn vị/ml)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	507	472	1,782	1,256
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	505	470	1,863	0,932
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	503	468	1,094	0,648
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO:99)	502	467	0,608	0,324
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	501	466	0,446	0,122
SPAM1-SILF (SEQ ID NO:100)	500	465	0,365	0,162
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	499	464	0,486	0,122
SPAM1-IVSI (SEQ ID NO:101)	498	463	0,527	0,203
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	497	462	0,365	0,162
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	495	460	0,689	0,770
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	493	458	0,689	0,851
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	491	456	0,851	0,729
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	489	454	1,985	3,321
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	487	452	1,134	1,580

Ví dụ 6

Phân tích glycan của rHuPH20 bằng LC-MS

Trong ví dụ này, nghiên cứu phân tích glycan của rHuPH20 (SEQ ID NO:122) được tiến hành bởi phân tích phổ khối của PH20 đượccắt bằng trypsin.

Nói một cách ngắn gọn, rHuPH20 (như được tạo ra ở Ví dụ 15C), được làm đông khô và tái tạo huyền phù trong đệm chứa 6M guanidin HCL, 0,002 M EDTA và 0,02 M

Tris, pH 8,28 đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mg/mL. DTT (10 mM nồng độ cuối cùng) được bổ sung và hỗn hợp protein/DTT được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi khử, iodoaxetamit được bổ sung đến nồng độ cuối cùng là 20 mM. Cuối cùng, trypsin (1:25 theo khối lượng) được bổ sung và hỗn hợp được ủ trong 20 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Dịch cắt bằng tripsin được phân tích bằng LC-MS. Nói một cách ngắn gọn, dịch cắt bằng tripsin được phun lên trên Cột pha đảo C18 sử dụng điều kiện được nêu trong Bảng 7 dưới đây. Số liệu MS được thu gom trên phổ khối kế Q-TOF Ultima bằng cách sử dụng ion hóa phun điện (ESI) theo kiểu ion dương. Số liệu thu được từ m/z 200-1950 theo kiểu MS. Glycopeptit được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm GlycoMod (www.expasy.ch/tools/glycomod/) để xác định loại glycan.

Bảng 7. Sự sắp đặt và các thông số LC-MS

Thông số	Sắp đặt		
Cột	Phenomenex Synergi Hydro-RP		
Nhiệt độ cột	30°C		
Pha động A	Nước khử ion chứa 0,2% axit formic		
Pha động B	Axetonitril chứa 0,2% axit formic		
Gradien	Thời gian (phút)	%A	%B
	0,0	97,0	3,0
	5,0	97,0	3,0
	144,0	60,0	40,0
	150,0	10,0	90,0
	160,0	10,0	90,0
	161,0	97,0	3,0
	180,0	97,0	3,0
Tốc độ chảy	0,2 mL/phút		
Thể tích phun	5 µL		
Thời gian vận hành (tổng)	180 phút		

Hyaluronidaza PH20 của người có một vị trí O-glycosyl hóa ở T475. Vị trí này được chiếm chỗ bởi glycan lõi loại 1 mà có một hoặc hai axit sialic. rHuPH20 được glycosyl hóa ở sáu gốc asparagin, bao gồm N82, N166, N235, N254, N368, và N393. Các kết quả cho thấy rằng N254 bị chiếm chỗ khoảng 75%, N393 bị chiếm chỗ khoảng 85%, và bốn vị trí còn lại, N82, N166, N235 và N368, bị chiếm chỗ nhiều hơn 99%. Tất cả ba loại N-glycan, loại manoza bậc cao, thể lai và phức hợp, đều có mặt trong rHuPH20. Nhìn chung, rHuPH20 chứa khoảng 45% glycan manoza bậc cao, 45% glycan phức hợp và 10% glycan lai. Khoảng 35% glycan trong số toàn bộ glycan là dạng anion, trong đó

25% chứa axit sialic và 10% còn lại chứa nhóm anion chưa được biết, có thể là nhóm phosphat. Hầu hết các glycan phức hợp được fucosyl hóa và glycan phức hợp anion chứa hầu hết là một axit sialic trong khi chỉ có một số glycan phức hợp chứa hai axit sialic. Mỗi gốc asparagin có khoảng 90% một loại glycan và một phần nhỏ khác có hai loại glycan, ngoại trừ N235. Loại glycan chính đối với mỗi gốc được nêu trong Bảng 8 dưới đây. Các gốc N82, N166 và N254 bị chiếm chỗ bởi glycan phức hợp. Các gốc N368 và N393 bị chiếm chỗ bởi glycan manoza bậc cao. Gốc N235 bị chiếm chỗ bởi khoảng 80% glycan manoza bậc cao, với khoảng 20% glycan phức hợp.

Bảng 8. Loại N-glycan ở gốc asparagin trong rHuPH20		
Vị trí glycan	Glycan manoza bậc cao	Glycan phức hợp
N82		X
N166		X
N235	~ 80%	~ 20%
N254		X
N368	X	
N393	X	

Ví dụ 7

Sự khử glycosyl hóa của hyaluronidaza PH20 của người bằng cách xử lý vbằng Endoglycosidaza

Trong ví dụ này, hyaluronidaza PH20 của người được khử glycosyl hóa bằng cách xử lý rHuPH20 được tinh chế (SEQ ID NO:122) bằng nhiều glycosidaza khác nhau và hoạt tính hyaluronidaza được đánh giá. Hyaluronidaza PH20 của người được glycosyl hóa ở sáu gốc asparagin khác nhau, bao gồm N82, N166, N235, N254, N368, và N393. Năm glycosidaza được sử dụng để tạo ra hyaluronidaza PH20 của người được khử glycosyl hóa, bao gồm: PNGaseF (New England Biolabs, Số loại P0704S, lô #34), mà phân cắt tất cả các N-glycan; EndoF1, mà phân cắt glycan loại manoza bậc cao và lai; EndoF2, mà phân cắt glycan loại phức hợp hai nhánh; EndoF3, mà phân cắt glycan phức hợp hai nhánh và nhiều nhánh hơn; và EndoH (New England Biolabs, Số loại P0702S), mà phân cắt glycan loại manoza bậc cao và lai. Do vậy, việc xử lý bằng PNGaseF dẫn đến sự khử glycosyl hóa hoàn toàn trong khi việc xử lý bằng endoglycosidaza chỉ dẫn đến sự khử glycosyl hóa một phần.

Để khử glycosyl hóa hoàn toàn, rHuPH20 được tinh chế (nồng độ cuối cùng 0,1 mg/mL) được ủ với PNGaseF (50.000 Đơn vị/ml) trong 50 nM đệm phosphat pH 7,2 qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Để khử glycosyl hóa một phần, rHuPH20 được tinh chế (nồng độ cuối cùng 0,5 mg/mL) được ủ với 0,3 Đơn vị/ml endoglycosidaza (EndoF1, EndoF2, EndoF3 hoặc EndoH) hoặc hỗn hợp của tất cả bốn endoglycosidaza trong 50 mM đệm natri axetat pH 5,0 qua đêm ở nhiệt độ 35°C. Sự khử glycosyl hóa rHuPH20 được phân tích bằng sự thay đổi khả năng lưu động của PH20 bởi SDS-PAGE. Hoạt tính enzym hyaluronidaza được xác định như được nêu trong Ví dụ 5.

Hyaluronidaza PH20 của người có khối lượng phân tử khoảng 66 kDa. Việc xử lý bằng EndoF1, EndoH hoặc hỗn hợp của EndoF1, EndoF2, EndoF3 và EndoH tạo ra hyaluronidaza PH20 của người được khử glycosyl hóa một phần như được xác định bằng sự thay đổi khả năng lưu động SDS-PAGE đến khối lượng phân tử khoảng 56 kDa. Việc xử lý bằng PNGaseF dẫn đến sự khử glycosyl hóa hoàn toàn của hyaluronidaza PH20 của người. Sự khử glycosyl hóa hoàn toàn của rHuPH20 không dẫn đến sự bất hoạt hoạt tính enzym hyaluronidaza trong khi sự cắt hết bằng PNGaseF để loại bỏ hoàn toàn N-glycan dẫn đến sự mất toàn bộ hoạt tính enzym hyaluronidaza (xem Bảng 9 dưới đây).

Bảng 9. ảnh hưởng của việc xử lý glycosidaza đến hoạt tính rHuPH20

rHuPH20 (U/ml)	PH20 đối chứng	EndoF1	EndoF2	EndoF3	EndoH	EndoF1, F2,F3,H	PNGaseF
1,0000	0,3195	0,2983	0,2573		0,2965	0,2144	1,9315
0,2000	0,7910	0,7656	0,6048	0,5880	0,7435	0,5366	1,9173
0,0400	1,4299	1,3450	1,3117	1,2255	1,3584	1,3877	1,9926
0,0080	1,8397	1,7338	1,6900	1,6698	1,6998	1,8418	1,9172

Ví dụ 8

Xử lý hyaluronidaza PH20 của người bằng chất ức chế glycosyl hóa

Trong ví dụ này, rHuPH20 (SEQ ID NO:122) được biểu hiện tạm thời trong điều kiện có mặt của mỗi trong số hai chất ức chế glycosyl hóa và hoạt tính và sự tiết hyaluronidaza được đánh giá. Kifunensin là chất ức chế hiệu nghiệm manosidaza I, enzym có liên quan đến sự xử lý glycan (xem ví dụ, Elbein et al., J Biol Chem, 265:15599-15605 (1990)). Tunicamyxin là hỗn hợp của các chất kháng sinh nucleosit tương đồng mà ức chế enzym GlcNAc phospho-transferaza (GPT), nhờ đó phong bế sự tổng hợp của tất cả các N-glycan (xem ví dụ, Bửhme et al., Eur. J. Biochem. 269:977-988 (2002)).

Nói một cách ngắn gọn, $1x10^6$ tế bào HZ24-2B2 biểu hiện rHuPH20 (xem ví dụ 14 dưới đây) được tạo mầm trong 24 mL môi trường CD-CHO đầy đủ trong hai bình thót cổ dung tích 125 mL. Tunicamyxin (được hòa tan trong DMSO) hoặc Kifunensin (được hòa tan mới trong nước) được bổ sung đến nồng độ cuối cùng là 5 µg/mL (chứa 12 µL DMSO). Để làm đối chứng, một bình thót cổ được tạo mầm với $1x10^6$ tế bào HZ24-2B2 biểu hiện rHuPH20 và 12 µL DMSO được bổ sung để làm tá dược lỏng đối chứng. Sau khi bổ sung tunicamyxin hoặc kifunensin, tế bào được ủ trong 4-6 giờ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2. Sau khi biểu hiện, 2 mL dịch nuôi cấy được lấy ra và được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 500g. Dịch nổi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C và viên tròn tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. 22 mL dịch nuôi cấy còn lại được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 500g. Dịch nổi được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được tái tạo huyền phù trong 22 mL môi trường CD-CHO đầy đủ trong hai bình thót cổ dung tích 125 mL ban đầu. Tunicamyxin hoặc Kifunensin được bổ sung vào dịch nuôi cấy ở nồng độ cuối cùng là 5 µg/mL và tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2. Hai mL (2 mL) dịch nuôi cấy được lấy ra khỏi mỗi bình thót cổ ở khoảng 24 giờ mỗi lần sau khi thay đổi môi trường. Đối với mỗi thời điểm, dịch nổi được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và viên tròn tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Sự biểu hiện của rHuPH20 được phân tích bằng phân tích thấm tách western và hoạt tính hyaluronidaza được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym HA được biotin hóa (như được nêu trong các ví dụ 3 và 5 trên đây).

Kết quả được thể hiện trong Bảng 10-13 dưới đây, bảng này đưa ra số lượng tế bào sống sót và hoạt tính PH20. Như được thể hiện trong Bảng 10-11, tunicamyxin ức chế hoạt tính PH20 trong cả môi trường nuôi cấy mô và bên trong tế bào và cũng dẫn đến sự mất hoàn toàn khả năng sống sót của tế bào. Ngoài ra, một giờ xử lý bằng tunicamyxin dẫn đến sự tích lũy của hyaluronidaza PH20 của người được khử glycosyl hóa bên trong

tế bào, như được xác định bằng sự thay đổi khả năng lưu động SDS-PAGE đến khối lượng phân tử khoảng 56 kDa trong các phân đoạn viên tròn tế bào. Như được thể hiện trong các Bảng 12-13, kifunensin không ảnh hưởng đến hoạt tính của PH20 trong khi phân tích thẩm tách western cho thấy rằng kifunensin ức chế sự biểu hiện và sự tiết của rHuPH20 trong tế bào được xử lý.

Bảng 10. ảnh hưởng của tunicamyxin đến khả năng sống sót của tế bào và hoạt tính PH20 trong môi trường nuôi cấy mô

Thời gian (giờ)	Có tunicamyxin		Không có tunicamyxin	
	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)
0	1,04	0,50	1,04	0,00
1	1,04	2,80	1,04	1,50
2	1,04	5,00	1,04	3,00
4	0,910	8,80	1,30	7,00
25	1,08	5,80	1,32	82,50
49	0,200	6,80	2,72	171,30
73	0,080	7,80	3,80	331,00
91	0	7,50	6,25	313,30

Bảng 11. ảnh hưởng của tunicamyxin đến khả năng sống sót của tế bào và hoạt tính PH20 trong viên tròn tế bào

Thời gian (giờ)	Có tunicamyxin		Không có tunicamyxin	
	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)
0	1,04	34,50	1,04	35,00
1	1,04	38,00	1,04	38,10
2	1,04	34,00	1,04	36,60

4	0,910	18,00	1,30	31,90
25	1,08	1,00	1,32	14,40
49	0,200	0,80	2,72	33,10
73	0,080	0,30	3,80	67,50
91	0	0,30	6,25	79,40

Bảng 12. ảnh hưởng của kifunensin đến khả năng sống sót của tế bào và hoạt tính PH20 trong môi trường nuôi cấy mô

Thời gian (giờ)	Có kifunensin		Không có kifunensin	
	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)	Tế bào sống sót (x106)	Hoạt tính PH20 (U/mL)
0	1	0,4	1	0,45
6	1	23,85	1	15,75
24	1,2	129,6	1,4	75,6
50	2,1	299,7	2,4	206,55
72	3	535,95	4,4	444,15
96	3,7	945	6,3	726,3
144	5,8	2968,65	8,5	2241

Bảng 13. ảnh hưởng của kifunensin đến khả năng sống sót của tế bào và hoạt tính PH20 trong viên tròn tế bào

Thời gian (giờ)	Có kifunensin		Không có kifunensin	
	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)	Tế bào sống sót ($x10^6$)	Hoạt tính PH20 (U/mL)
0	1	22,25	1	23
6	1	21,25	1	27
24	1,2	27,75	1,4	14,45

50	2,1	43	2,4	26
72	3	98,75	4,4	52,75
96	3,7	208,75	6,3	167,5
144	5,8	497,25	8,5	107

Ví dụ 9

Sự biểu hiện tạm thời của rHuPH20 trong thể đột biến CHO kháng lectin

Trong ví dụ này, rHuPH20 được biểu hiện tạm thời trong bốn thể đột biến CHO kháng lectin và hoạt tính và sự tiết hyaluronidaza được đánh giá. Thể đột biến CHO kháng lectin được tóm tắt trong Bảng 14 dưới đây. Tế bào Pro$^-$5 khuyết galactosyltransferaza β4galT-6 làm giảm *N*-glycan được galactosyl hóa (xem, ví dụ, Lee et al. *J. Biol. Chem.* 276:13924-13934 (2001)). Tế bào Lec1 không có hoạt tính *N*-axetylglucosaminyltranferaza I và do vậy không tổng hợp glycan phức hợp hoặc lai (xem, ví dụ, Chen and Stanley, *Glycobiology*, 13:43-50 (2003)). Lec2 và Lec8 thiếu chất vận chuyển nucleotit-đường, mà vận chuyển nucleotit-đường qua ER hoặc mạng lưới golgi. Tế bào Lec2 không thể di chuyển axit CMP-sialic (cụ thể là CMP-NeuAc) do đó gây ra sự biểu hiện của bề mặt tế bào asialo (xem, ví dụ, Eckhardt et al., *J. Biol. Chem.* 273:20189-20195 (1998)). Tế bào Lec8 không thể di chuyển UDP-galactoza do đó làm cho glycan không có galactoza (xem, ví dụ, Bakker et al., *Glycobiology*, 15:193-201 (2005)).

Bảng 14. Thể đột biến CHO kháng lectin		
Dòng CHO	Sự thay đổi hóa sinh	Sự thay đổi di truyền
Pro$^-$5 (gốc)	↓ Gal trên N-glycan	Không biểu hiện *β4galt6*
Lec1	↓ GlcNAc-TI	Sự chèn/loại bỏ trong *Mgat1* ORF
Lec2	↓ Chất vận chuyển Golgi CMP-axit sialic	Đột biến trong *Slc35a1* ORF
Lec8	↓ Chất vận chuyển Golgi UDP-Gal	Đột biến trong *Slc35a2* ORF

Nói một cách ngắn gọn, PH20sHis (mã hóa PH20 được gắn thẻ his, SEQ ID NO:187) được biểu hiện tạm thời trong mỗi trong số bốn chủng của thể đột biến CHO kháng lectin, bao gồm Lec1 (Số loại CRL-1735, ATCC), Lec2 (Số loại CRL-1736, ATCC), Lec8 (Số loại CRL-1737, ATCC) và Pro$^-$5 (Số loại CRL-1781) như được nêu trong Ví dụ 2A trên đây. Ngoài ra, HZ24-mut(B/S) (mã hóa PH20 được cắt cụt ở axit amin 482, SEQ ID NO:122) được biểu hiện tạm thời trong tế bào Pro$^-$5 và dùng làm đối chứng âm tính, tế bào Pro$^-$5 được chuyển nhiễm giả. Môi trường nuôi cấy tế bào thu được được phân tích bằng phân tích thẩm tách western và hoạt tính hyaluronidaza được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym HA được biotin hóa (như được nêu trong các ví dụ 3 và 5 trên đây).

Các kết quả cho thấy rằng rHuPH20 biểu hiện trong thể đột biến Lec được tiết vào môi trường, như được chứng tỏ bởi băng protein ở khoảng 66 kDa. Kết quả của thử nghiệm enzym bHA được nêu trong Bảng 15 dưới đây, bảng này thiết lập cho thể đột biến CHO kháng lectin, plasmit mã hóa PH20 được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào, và hoạt tính PH20 ở pH5,5 đối với cả tỷ lệ pha loãng 1:27 và 1:81. rHuPH20 được biểu hiện bởi tế bào đột biến Lec là có hoạt tính enzym.

Bảng 15. Hoạt tính PH20 (U/mL) của rHuPH20 được biểu hiện tạm thời trong tế bào đột biến Lec.

Thể đột biến lectin	Pro-5	Pro-5	Lec1	Lec2	Lec8	Pro-5
Plasmit	HZ24-mut(B/S)	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	Chuyển nhiễm giả
Hoạt tính PH20 (1:27)	0,6615	0,297	0,54	0,675	0,2565	0,081
Hoạt tính PH20 (1:81)	1,1745	0,6075	0,7695	1,053	0,567	0,1215

Ví dụ 10

Sự phát sinh đột biến trực tiếp điểm của vị trí N-glycosyl hóa của hyaluronidaza PH20 người

Trong ví dụ này, thể đột biến khử glycosyl hóa hyaluronidaza PH20 của người đặc hiệu vị trí N-glycan được tạo ra và mô hình tiết và hoạt tính enzym hyaluronidaza của chúng được đánh giá. Thể đột biến khử glycosyl hóa đặc hiệu vị trí N-glycan và loại glycan được nêu trong Bảng 16 dưới đây.

PH20sHis (SEQ ID NO:210) được sử dụng làm khuôn cho sự phát sinh đột biến của mỗi gốc asparagin đối với alanin sử dụng bộ kit phát sinh đột biến trực tiếp điểm QuikChange® (Số loại 200518, Stratagene). Protein được mã hóa bởi ADN khuôn tương ứng với PH20sHis (SEQ ID NO:187), dòng PH20 của người chứa thẻ HexaHis (SEQ ID NO:142) sau axit amin S490. PH20sHis kiểu dại và thể đột biến được khử glycosyl hóa được nêu trong Bảng 16. Sáu thể đột biến đơn được tạo ra, một thể đột biến cho mỗi trong số các vị trí N-glycosyl hóa. Ngoài ra, ba thể đột biến kép và một thể đột biến bộ ba được tạo ra đối với các asparagin N82, N166 và N254, tất cả các thể đột biến này đều được chiếm chỗ bởi glycan loại phức hợp. Cuối cùng, thể đột biến kép N368A/N393A được tạo ra, khuyết glycan manoza bậc cao. Các thể đột biến được chuyển nhiễm vào tế bào CHO-S và sự biểu hiện được tiến hành như được nêu trong Ví dụ 2A. Sự tiết vào môi trường và hoạt tính hyaluronidaza được xác định như được nêu trong các ví dụ 3 và 5, trên đây.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây, bảng này nêu sự đột biến, loại glycan, protein có được tiết vào môi trường hay không và hoạt tính hyaluronidaza ở cả pH 5,5 và pH 7,4. Phân tích thẩm tách western cho thấy rằng sự đột biến của các gốc N82, N166, N235 và N254 không ảnh hưởng đến việc tiết protein rHuPH20 vào môi trường. Theo cách khác, sự đột biến của các gốc N368A và N368A/N393A ngăn chặn sự biểu hiện và tiết của PH20, như được chứng minh bởi sự khuyết protein ở khoảng 66 kDa trong môi trường. Sự đột biến của gốc N393A dẫn đến sự biểu hiện protein giảm, nhưng rHuPH20 được quan sát thấy trong môi trường, như được chứng tỏ bởi băng protein ở khoảng 66 kDa. Sự đột biến của các gốc N82, N166 và/hoặc N254 không có ảnh hưởng đến hoạt tính rHuPH20. Các gốc này được chiếm chỗ bởi glycan phức hợp. Trái lại, sự

đột biến của các gốc N235, N368 và/hoặc N393, mà chứa glycan manoza bậc cao, dẫn đến sự mất hoàn toàn hoạt tính phát hiện được trong môi trường do thiếu sự tiết.

Bảng 16. Thể đột biến khử glycosyl hóa hyaluronidaza PH20 của người

Thể đột biến	SEQ ID NO	Loại glycan	Sự tiết	Hoạt tính ở pH 5,5	Hoạt tính ở pH 7,4
PH20sHis (cha mẹ)	187	Cả hai	Có	Có	Có
N82A	202	Phức hợp	Có	Có	Có
N166A	203	Phức hợp	Có	Có	Có
N235A	204	Manoza bậc cao (80%) Phức hợp (20%)	Có	Không	Không
N254A	205	Phức hợp	Có	Có	Có
N368A	188	Manoza bậc cao	Không	Không	Không
N393A	189	Manoza bậc cao	Có (Yếu)	Không	Không
N82A/N166A	206	Phức hợp	Có	Có	Có
N82A/N254A	207	Phức hợp	Có	Có	Có
N166A/N254A	208	Phức hợp	Có	Có	Có
N82A/N166A/N254A	209	Phức hợp	Có	Có	Có
N368A/N393A	190	Manoza bậc cao	Không	Không	Không

Phân tích huỳnh quang miễn dịch của tế bào CHO với kháng thể kháng PH20 được sử dụng để hiển thị hóa sự biểu hiện của thể đột biến khử glycosyl hóa đặc hiệu vị trí N-glycan N368A, N393A và N368A/N393A. Tế bào CHO được tạo mầm cho sự nuôi cấy lớp đơn lên trên lam kính ngăn 8 giếng với 200 µL tế bào ở mật độ 2,5 x 10^4 tế bào cho mỗi ml Môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (DMEM) chứa 10 % huyết thanh bào

thai bò (FBS) và được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong không khí ẩm có 5 % CO_2. Tế bào được chuyển nhiễm sau 36 giờ ở 80 % sự suy biến sử dụng Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) như sau. ADN (0,4 µg trong 50 µL DMEM không có huyết thanh) và Lipofectamine™ 2000 (1 µL trong DMEM không có huyết thanh) được trộn nhẹ nhàng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó được bổ sung vào mỗi giếng chứa tế bào và 100 µL môi trường không có huyết thanh. Tiến hành trộn bằng cách lắc đĩa ngược và về phía trước. Sau đó, tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ CO_2 trong 4-6 giờ sau đó môi trường được thay thế bằng môi trường chứa 10 % FBS. Tại thời điểm 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, tế bào trên lam kính ngăn được cố định bằng paraformaldehyt 4 % trong 15 phút. Tế bào được rửa 3 lần bằng PBS và 200 µL dung dịch 1 % NP-40/PBS được bổ sung và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được rửa 3 lần bằng PBS và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trước khi đánh dấu miễn dịch.

Để đánh dấu miễn dịch các tế bào, mẫu được phong bế bằng 15 % huyết thanh dê thông thường trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được ủ với dung dịch 1:20 của IgG thỏ kháng PH20 được pha loãng trong 5 % huyết thanh dê thông thường trong PBS trong 2 giờ. Cuối cùng, tế bào được rửa 3 lần bằng PBS sau đó là ủ với IgG dê kháng thỏ được liên hợp FITC trong 1 giờ sau đó là hiển thị hóa. Ngoài ra, dung dịch tăng dần chứa DAPI cho phép nhuộm màu nhân. Phân tích huỳnh quang miễn dịch sử dụng kháng thể kháng PH20 cho thấy rằng các đột biến N368A và N393A làm cho PH20 tích lũy bên trong các tế bào.

Tóm tắt nghiên cứu N-glycosyl hóa

Như được thể hiện trong các ví dụ 7-10 trên đây, sự glycosyl hóa được liên kết với N là cần thiết cho sự cuộn gập chính xác và hoạt tính enzym của rHuPH20. Sự khử glycosyl hóa hoàn toàn của rHuPH20, được thực hiện bởi sự cắt hoàn toàn bằng PNGaseF hoặc bằng sự ức chế glycosyl hóa trong quá trình sinh tổng hợp bằng cách xử lý với tunicamyicn, loại bỏ hoàn toàn hoạt tính enzym phát hiện được. Ngoài ra, rHuPH20 chưa được glycosyl hóa được thấy là tích lũy trong tế bào. Trái lại, rHuPH20 được khử glycosyl hóa một phần, được thực hiện bằng cách xử lý bằng kifunensin hoặc bằng cách biểu hiện trong các thể đột biến Lec, giữ được hoạt tính enzym. Cuối cùng, phân tích đột biến chi tiết sử dụng sự phát sinh đột biến trực tiếp điểm cho thấy rằng sự có mặt của glycan loại manoza cao là cần thiết để sản xuất rHuPH20 tan được, có hoạt tính enzym.

Ví dụ 11

Sản xuất dòng tế bào biểu hiện rHuPH20 tan được

Plasmit HZ24 (được nêu trong SEQ ID NO:140) được sử dụng để chuyển nhiễm Trứng chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO) (xem ví dụ đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 10,795,095, 11/065,716 và 11/238,171). Vectơ plasmit HZ24 để biểu hiện rHuPH20 tan được chứa khung vectơ pCI (Promega), ADN mã hóa axit amin 1-482 của hyaluronidaza PH20 của người (SEQ ID NO:110), vị trí tiếp nhận riboxom bên trong (IRES) từ virut ECMV (Clontech), và gen dihydrofolat reductaza (DHFR) của chuột. Khung vectơ pCI còn bao gồm ADN mã hóa gen kháng Beta-lactamaza (AmpR), gốc tái bản f1, vùng trình tự tăng cường/trình tự khởi động trung gian-sớm của cytomegalovirut (CMV), intron khảm, và tín hiệu polyadenyl hóa muộn SV40 (SV40). ADN mã hóa cấu trúc rHuPH20 tan được chứa vị trí NheI và trình tự liên ứng Kozak trước ADN mã hóa methionin ở vị trí axit amin 1 của trình tự tín hiệu 35 axit amin tự nhiên của PH20 của người, và codon kết thúc sau ADN mã hóa tyrosin tương ứng với vị trí axit amin 482 của hyaluronidaza PH20 của người được nêu trong SEQ ID NO:107, sau đó là vị trí giới hạn BamHI. Cấu trúc pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24), do vậy, tạo ra loại mARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động CMV mà mã hoá axit amin 1-482 của PH20 của người (được nêu trong SEQ ID NO:109 và axit amin 1-186 của dihydrofolat reductaza của chuột (được nêu trong SEQ ID NO:141), được phân tách bởi vị trí tiếp nhận ribosom bên trong (IRES).

Tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm sinh trưởng trong môi trường CD-CHO được cải biến GIBCO cho các tế bào DHFR(-), được bổ sung 4 mM Glutamin và 18 ml/L Plurionic F68/L (Gibco), được tạo mầm ở mật độ 0,5 x 10^6 tế bào/ml trong bình lắc trong quá trình chuẩn bị cho việc chuyển nhiễm. Tế bào được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO_2 trong thiết bị ủ được làm ẩm, lắc ở tốc độ 120 vòng/phút. Tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm sinh trưởng theo hàm mũ được kiểm tra về khả năng sống sót trước khi chuyển nhiễm.

Sáu mươi triệu tế bào sống sót của dịch nuôi cấy tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm được tạo viên và được tái tạo huyền phù đến mật độ 2 × 10^7 tế bào trong 0,7 mL của 2x đệm chuyển nhiễm (2x HeBS: 40 mM Hepes, pH 7,0, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na_2HPO_4, 12 mM dextroza). Bổ sung 0,09 mL (250 µg) của plasmit HZ24 thẳng (được duỗi thẳng bằng cách cắt qua đêm bằng Cla I (New England Biolabs)

vào mỗi phần phân ước của tế bào được tái tạo huyền phù, và dung dịch tế bào/ADN được đưa vào cuvet xung điện BTX (Gentronics) độ hở 0,4 cm ở nhiệt độ phòng. Xung điện đối chứng âm tính được tiến hành mà không có ADN plasmit được trộn với tế bào. Hỗn hợp tế bào/plasmit được xung điện với sự phóng điện của tụ điện là 330 V và 960 µF hoặc ở 350 V và 960 µF.

Tế bào được lấy ra khỏi cuvet sau khi xung điện và được đưa vào 5 mL môi trường CD-CHO cải biến cho tế bào DHFR(-), được bổ sung 4 mM Glutamin và 18 ml/L Plurionic F68/L (Gibco), và được để sinh trưởng trong giếng của đĩa nuôi cấy mô bao gồm 6 giếng mà không có sự chọn lọc trong 2 ngày ở nhiệt độ 37° C trong 5% CO_2 trong thiết bị ủ được làm ẩm.

Hai ngày sau khi xung điện, 0,5 mL môi trường nuôi cấy mô được lấy ra khỏi mỗi giếng và được thử nghiệm về sự có mặt của hoạt tính hyaluronidaza, sử dụng thử nghiệm vi độ đục được bộc lộ trong Ví dụ 12. Kết quả được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17. Hoạt tính hyaluronidaza ban đầu của tế bào CHO DG44 được chuyển nhiễm HZ24 tại thời điểm 40 giờ sau khi chuyển nhiễm

	Pha loãng	Đơn vị hoạt tính /ml
Chuyển nhiễm 1 330V	1 đến 10	0,25
Chuyển nhiễm 2 350V	1 đến 10	0,52
Đối chứng âm tính	1 đến 10	0,015

Tế bào từ Chuyển nhiễm 2 (350V) được thu gom từ giếng nuôi cấy mô, được đếm và được pha loãng từ 1 $\times 10^4$ đến 2 $\times 10^4$ tế bào sống sót cho mỗi mL. 0,1 mL phần phân ước của hỗn dịch tế bào được chuyển tới mỗi giếng của năm đĩa nuôi cấy mô đáy tròn có 96 giếng. Một trăm microlit môi trường CD-CHO (GIBCO) chứa chất bổ sung 4 mM GlutaMAX™-1 (GIBCO™, Invitrogen Corporation) và không có chất bổ sung hypoxanthin và thymidin được bổ sung vào các giếng chứa tế bào (thể tích cuối cùng 0,2 mL). 10 dòng vô tính được nhận dạng từ 5 đĩa được sinh trưởng mà không có methotrexat (Bảng 18).

Bảng 18. Hoạt tính hyaluronidaza của dòng vô tính được nhận dạng	
ID đĩa/giếng	Hyaluronidaza tương đối
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

Sáu dòng vô tính HZ24 được mở rộng trong dịch nuôi cấy và được đưa vào bình lắc dưới dạng hỗn dịch tế bào đơn. Các dòng vô tính 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, và 4D10 được cấy vào đĩa nuôi cấy mô đáy tròn có 96 giếng sử dụng phương pháp pha loãng vô hạn hai chiều trong đó tế bào được pha loãng theo tỷ lệ 1:2 ở phía dưới đĩa, và 1:3 cách hai bên đĩa, bắt đầu ở 5000 tế bào trong giếng trên cùng bên tay trái. Các dòng vô tính được pha loãng được sinh trưởng trong nền của 500 tế bào CHO DG44không được chuyển nhiễm cho mỗi giếng, để cung cấp các yếu tố sinh trưởng cần thiết cho các ngày bắt đầu trong môi trường nuôi cấy. 10 đĩa được thực hiện cho mỗi dòng phụ, với 5 đĩa chứa 50 nM methotrexat và 5 đĩa không chứa methotrexat.

Dòng 3D3 sản xuất 24 dòng phụ nhìn thấy được (13 dòng phụ từ việc không xử lý bằng methotrexat, và 11 dòng từ việc xử lý bằng 50 nM methotrexat. Hoạt tính hyaluronidaza đáng kể được xác định trong dịch nổi từ 8 trong số 24 dòng phụ (>50 Đơn vị/ml), và 8 dòng phụ này được phát triển vào bình nuôi cấy mô T-25. Dòng vô tính được phân lập từ quy trình xử lý methotrexat được phát triển trong điều kiện có mặt 50 nM methotrexat. Dòng 3D35M được phát triển tiếp trong 500 nM methotrexat làm tăng số dòng vô tính tạo ra vượt hơn 1000 Đơn vị/ml trong bình lắc (dòng vô tính 3D35M; hoặc

Gen1 3D35M). Sau đó, ngân hàng tế bào đầu dòng (MCB) của tế bào 3D35M được điều chế.

Ví dụ 12

Xác định hoạt tính hyaluronidaza của rHuPH20 tan được

Hoạt tính hyaluronidaza của rHuPH20 tan được trong mẫu như dịch nuôi cấy tế bào, phân đoạn tinh chế và dung dịch được tinh chế được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm turbidometric, mà dựa trên sự tạo thành chất kết tủa không tan khi axit hyaluronic liên kết với albumin huyết thanh. Hoạt tính được xác định bằng cách ủ rHuPH20 tan được với natri hyaluronat (axit hyaluronic) trong khoảng thời gian đã đặt (10 phút) và sau đó kết tủa natri hyaluronat chưa được cắt với sự bổ sung albumin huyết thanh được axit hóa. Độ đục của mẫu thu được được xác định ở 640 nm sau giai đoạn phát triển 30 phút. Việc làm giảm độ đục thu được do hoạt tính enzym trên cơ chất natri hyaluronat là thước đo của hoạt tính hyaluronidaza rHuPH20 tan được. Phương pháp được tiến hành sử dụng đường cong định chuẩn được tạo ra với các dung dịch pha loãng của mẫu chuẩn tham chiếu thực hiện thử nghiệm rHuPH20 tan được, và tiến hành xác định hoạt tính của mẫu so với đường cong định chuẩn này.

Các dung dịch pha loãng của mẫu được điều chế trong dung dịch pha loãng enzym. Dung dịch pha loãng enzym được điều chế bằng cách hòa tan 33,0 ± 0,05 mg gelatin được thủy phân trong 25,0 mL của 50 mM đệm phản ứng PIPES (140 mM NaCl, 50 mM PIPES, pH 5,5) và 25,0 mL SWFI, và pha loãng 0,2 mL dung dịch Buminat 25% vào hỗn hợp và lắc xoáy trong 30 giây. This được tiến hành trong 2 giờ sử dụng và được bảo quản trên đá cho đến khi cần. Mẫu được pha loãng 1-2 U/mL được ước tính. Thông thường, sự pha loãng tối đa cho mỗi bước không vượt quá 1:100 và kích cỡ mẫu ban đầu cho lần pha loãng đầu tiên là không ít hơn 20 µL. Thể tích mẫu tối thiểu cần để tiến hành thử nghiệm là: Mẫu xử lý, Phân đoạn FPLC: 80 µL; Dịch nổi nuôi cấy mô:1 mL; Nguyên liệu cô đặc 80 µL; được tinh chế hoặc Nguyên liệu được tinh chế hoặc nguyên liệu của bước cuối cùng: 80 µL. Tiến hành pha loãng lặp lại ba lần trong đĩa 96 giếng liên kết protein thấp, và 30 µL của mỗi dịch pha loãng được chuyển tới đĩa đáy đen/trong Optilux (BD BioSciences).

Các dung dịch pha loãng của rHuPH20 tan được chưa biết có nồng độ 2,5 U/mL được điều chế trong dung dịch pha loãng enzym để tạo ra đường cong chuẩn và được bổ sung vào đĩa Optilux lặp lại ba lần. Các dung dịch pha loãng bao gồm 0 U/mL, 0,25 U/mL, 0,5 U/mL, 1,0 U/mL, 1,5 U/mL, 2,0 U/mL, và 2,5 U/mL. Các giếng "mẫu trống chất phản ứng" chứa 60 µL dung dịch pha loãng enzym được bao gồm trong đĩa này để làm đối chứng âm tính. Sau đó, đĩa được đậy nắp và được làm ấn trên bệ máy gia nhiệt trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C. Nắp được lấy ra và đĩa được lắc trong 10 giây. Sau khi lắc, đĩa được đưa trở lại bệ máy gia nhiệt và thiết bị vận chuyển chất lỏng MULTIDROP 384 được mồi với dung dịch natri hyaluronat 0,25 mg/mL ấm (được điều chế bằng cách hòa tan 100 mg natri hyaluronat (LifeCore Biomedical) trong 20,0 mL SWFI. Dung dịch này được trộn bằng cách xoay nhẹ nhàng và/hoặc lắc ở nhiệt độ 2-8°C trong 2-4 giờ, hoặc cho đến khi được hòa tan hoàn toàn). Đĩa phản ứng được chuyển tới MULTIDROP 384 và phản ứng được bắt đầu bằng cách ấn nút khởi động để phân phối 30 µL natri hyaluronat vào mỗi giếng. Sau đó, đĩa được lấy ra khỏi MULTIDROP 384 và được lắc trong 10 giây trước khi được chuyển đến bệ máy gia nhiệt với nắp đậy đĩa được thay thế. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút.

MULTIDROP 384 được điều chế để làm dừng phản ứng bằng cách mồi bộ máy với dung dịch làm việc huyết thanh và thay đổi thể tích đặt sẵn đến 240 µL. (25 mL Dung dịch gốc huyết thanh [1 thể tích của huyết thanh ngựa (Sigma) được pha loãng bằng 9 thể tích của 500 mM dung dịch đệm axetat và độ pH được điều chỉnh đến 3,1 bằng axit clohydric] trong 75 mL của dung dịch đệm axetat 500 mM). Đĩa được lấy ra khỏi bệ máy gia nhiệt và được đặt lên trên MULTIDROP 384 và 240 µL dung dịch làm việc huyết thanh được phân phối vào các giếng. Đĩa được lấy ra và được lắc trên thiết bị đọc đĩa trong 10 giây. Sau 15 phút nữa, độ đục của mẫu được xác định ở bước sóng 640 nm và hoạt tính hyaluronidaza (tính bằng U/mL) của mỗi mẫu được xác định bằng cách hiệu chỉnh đường cong chuẩn.

Hoạt tính riêng (Đơn vị/mg) được tính toán bằng cách chia hoạt tính hyaluronidaza (U/ml) cho nồng độ protein (mg/mL).

Ví dụ 13

Sản xuất và tinh chế sPH20 của người Gen1

A.Quy trình thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5 L

Lọ 3D35M được làm tan đông và được phát triển từ bình lắc qua bình lắc dung tích 1 L trong môi trường CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) được bổ sung 100 nM Methotrexat và GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Tế bào được chuyển từ bình lắc đến thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5 L (Braun) ở mật độ cấy nhiễm là 4×10^5 tế bào sống sót cho mỗi mL. Các thông số là điểm đặt nhiệt độ 37 °C, pH 7,2 (điểm đặt lúc bắt đầu), với điểm đặt oxy hòa tan 25% và sự phủ khí 0-100 cc/phút. Tại thời điểm 168 giờ, 250 ml Môi trường Cấp dưỡng #1 (CD CHO với 50 g/L Glucoza) được bổ sung. Tại thời điểm 216 giờ, 250 ml môi trường Cấp dưỡng #2 (CD CHO với 50 g/L Glucoza và 10 mM Natri Butyrat) được bổ sung, và tại thời điểm 264 giờ 250 ml môi trường Cấp dưỡng #2 được bổ sung. Quy trình này tạo ra hiệu suất cuối cùng là 1600 Đơn vị cho mỗi mL với mật độ tế bào cực đại là 6×10^6 tế bào/ml. Mục đích của việc bổ sung natri butyrat là để tăng cường một cách đáng kể sự sản xuất rHuPH20 tan được trong giai đoạn sản xuất cuối cùng.

Môi trường được đặt điều kiện từ dòng 3D35M được lắng trong bằng cách lọc sâu và lọc thẩm tách dòng tiếp tuyến vào 10 mM Hepes pH 7,0. Sau đó, rHuPH20 tan được được được tinh chế bằng sắc ký liên tiếp trên cột trao đổi ion Q Sepharoza (Pharmacia), sắc ký tương tác kỵ nước Phenyl Sepharoza (Pharmacia), phenyl boronat (Prometics) và sắc ký Hydroxapatit (Biorad, Richmond, CA).

rHuPH20 tan được được liên kết với Q Sepharoza và được rửa giải ở 400 mM NaCl trong cùng đệm. Nước giải hấp được pha loãng bằng 2M amoni sulfat đến nồng độ cuối cùng là 500 mM amoni sulfat và được đi qua cột (cột phụ thấp) Phenyl Sepharoza, sau đó là liên kết trong cùng điều kiện với nhựa phenyl boronat. rHuPH20 tan được được rửa giải từ nhựa phenyl sepharoza trong Hepes pH 6,9 sau khi rửa ở độ pH 9,0 trong 50 mM bixin mà không có amoni sulfat. Nước giải hấp được nạp lên trên nhựa hydroxyapatit gồm ở độ pH 6,9 trong 5 mM kali phosphatvà1 mM $CaCl_2$ và được rửa giải với 80 mM kali phosphat, pH 7,4 với 0,1 mM $CaCl_2$.

rHuPH20 tan được được tinh chế thu được có hoạt tính riêng lớn hơn 65.000 USP Đơn vị/mg protein theo cách của thử nghiệm vi độ đục (Ví dụ 12) sử dụng mẫu chuẩn tham chiếu USP. sPH20 được tinh chế được rửa giải dưới dạng đỉnh đơn từ 24 đến 26 phút từ cột Pharmacia 5RPC styren divinylbenzen với gradien từ 0,1% TFA/H_2O đến

0,1% TFA/90% Axetonitril/10% H_20 và được phân giải dưới dạng băng đơn rộng có khối lượng 61 kDa bởi điện di SDS mà giảm xuống băng rõ có khối lượng 51 kDa khi xử lý bằng PNGASE-F. Việc giải trình tự axit amin đầu cùng N cho thấy rằng peptit dẫn đầu được loại bỏ một cách hiệu quả.

B. Quy trình phát triển dịch nuôi cấy tế bào ngược dòng thành dịch nuôi cấy tế bào trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 100 L

Quy trình có quy mô tăng được sử dụng để tinh chế một cách riêng rẽ rHuPH20 tan được từ bốn lọ khác nhau của tế bào 3D35M để sản xuất 4 mẻ riêng rẽ của sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C và HUA0420C. Mỗi lọ được phát triển riêng rẽ và được nuôi cấy thông qua thiết bị phản ứng sinh học dung tích 125 L, sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột. Mẫu được lấy trong suốt quy trình để đánh giá các thông số như hiệu suất enzym. Phần mô tả quy trình được nêu dưới đây đưa ra các đặc điểm kỹ thuật đặc trưng đối với các thông số như thể tích môi trường cấp và bắt đầu của thiết bị phản ứng sinh học, mật độ tế bào di chuyển, và thể tích rửa và rửa giải. Con số chính xác thay đổi không đáng kể đối với mỗi mẻ, và được nêu chi tiết trong các Bảng từ 24 đến 30.

Bốn lọ tế bào được làm tan đông trong bể nước nhiệt độ 37°C, CD CHO chứa 100 nM methotrexat và 40 mL/L GlutaMAX được bổ sung và tế bào được ly tâm. Tế bào được tái tạo huyền phù trong bình lắc dung tích 125 mL với 20 mL môi trường mới và được đặt trong thiết bị ủ nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Tế bào được phát triển đến thể tích 40 mL trong bình lắc dung tích 125 mL. Khi mật độ tế bào đạt đến 1,5 – 2,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc dung tích 125 mL trong 100 mL thể tích môi trường nuôi cấy. Bình được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến 1,5 – 2,5 x 106 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc dung tích 250 mL trong 200 mL thể tích môi trường nuôi cấy, và bình được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến 1,5 – 2,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc dung tích 1 L trong 800 mL thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến 1,5 – 2,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc dung tích 6 L trong 5 L thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến 1,5 – 2,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được

phát triển trong bình lắc dung tích 36 L trong 20 L thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2.

Thiết bị phản ứng dung tích 125 L được làm tiệt trùng bằng hơi nước ở nhiệt độ 121°C, 20 PSI và 65 L môi trường CD CHO được bổ sung. Trước khi sử dụng, thiết bị phản ứng được kiểm tra về sự nhiễm tạp. Khi mật độ tế bào trong bình lắc dung tích 36 L đạt đến 1,8 -2,5 x 10^6 tế bào/mL, 20 L dịch nuôi cấy tế bào được chuyển từ bình lắc dung tích 36L đến thiết bị phản ứng sinh học dung tích 125 L (Braun), tạo ra thể tích cuối cùng là 85 L và mật độ tạo mầm khoảng 4 × 10^5 tế bào/mL. Các thông số là điểm đặt nhiệt độ, 37°C; pH: 7,2; oxy hòa tan: 25% ± 10%; tốc độ máy lắc 50 vòng/phút; áp suất bình 3 psi; phun không khí 1 L/phút; phủ khí: 1 L/phút. Thiết bị phản ứng được lấy mẫu hàng ngày để đếm tế bào, kiểm tra độ pH, phân tích môi trường, sự sản xuất và duy trì protein. Thức ăn dinh dưỡng được bổ sung trong chu trình. Vào ngày thứ 6, 3,4 L Môi trường Cấp dưỡng #1 (CD CHO + 50 g/L Glucoza + 40 mL/L GlutaMAX™-1) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 36,5°C. Vào ngày thứ 9, 3,5 L Cấp dưỡng #2 (CD CHO + 50 g/L Glucoza + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1,1 g/L Natri Butyrat) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 36°C. Vào ngày thứ 11, 3,7 L Cấp dưỡng #3 (CD CHO + 50 g/L Glucoza + 40 mL/L GlutaMAX™-1 + 1,1 g/L Natri Butyrat) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 35,5°C. Thiết bị phản ứng được thu hoạch tại thời điểm 14 ngày hoặc khi khả năng sống sót của tế bào giảm dưới 50%. Quy trình này dẫn đến sự sản xuất rHuPH20 tan được với hoạt tính enzym là 1600 Đơn vị/ml với mật độ tế bào cực đại là 8 triệu tế bào/mL. Vào lúc thu hoạch, dịch nuôi cấy được lấy mẫu để soi kính hiển vi điện tử truyền (TEM) đối với mycoplasma, sự nhiễm tạp vi sinh vật, nội độc tố, và virut *in vitro* và *in vivo*, đối với các hạt virut, và hoạt tính enzym.

Một trăm lít dịch nuôi cấy tế bào thu hoạch từ thiết bị phản ứng sinh học được lọc qua chuỗi thiết bị lọc hộp dùng một lần có môi trường polyeteulfon (Sartorius): đầu tiên qua hộp sâu 8,0 µm, hộp sâu 0,65 µm, hộp 0,22 µm, và cuối cùng qua thiết bị lọc 0,22 µm Sartopore 2000 cm^2 và vào túi bảo quản vô trùng dung tích 100 L. Dịch nuôi cấy được cô 10 lần sử dụng hai TFF với thiết bị lọc xoắn Polyetesulfon 30 kDa MWCO (Millipore), sau đó là 6 lần trao đổi đệm với 10 mM HEPES, 25 mM Na_2SO_4, pH 7,0 vào

thiết bị lọc cuối cùng 0,22 µm túi bảo quản vô trùng dung tích 20 L. Bảng 19 cung cấp số liệu theo dõi có liên quan đến các bước nuôi cấy tế bào, thu hoạch, cô và trao đổi đệm.

Bảng 19. Số liệu theo dõi đối với các bước nuôi cấy tế bào, thu hoạch, cô và trao đổi đệm.

Thông số	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Thời gian từ lúc làm tan đông đến lúc cấy nhiễm thiết bị phản ứng sinh học dung tích 100 L (ngày)	21	19	17	18
Mật độ cấy nhiễm 100 L ($\times 10^6$ tế bào/mL)	0,45	0,33	0,44	0,46
Thời gian nhân đôi trong sự sinh trưởng hàm mũ (giờ)	29,8	27,3	29,2	23,5
Mật độ tế bào tối đa ($\times 10^6$ tế bào/mL)	5,65	8,70	6,07	9,70
Khả năng sống sót dịch thu hoạch (%)	41	48	41	41
Độ chuẩn dịch thu hoạch (U/ml)	1964	1670	991	1319
Thời gian trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 100L (ngày)	13	13	12	13
Thể tích dịch sinh học được lắng trong (mL)	81800	93300	91800	89100
Thử nghiệm enzym dịch thu hoạch được lắng trong (U/mL)	2385	1768	1039	1425
Thử nghiệm enzym chất cô (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Thử nghiệm enzym chất cô được trao đổi đệm (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Thử nghiệm enzym chất cô được trao đổi đệm được lọc (U/mL)	21550	10882	9471	8527

Thử nghiệm chất cô được trao đổi đệm (mL)	10699	13578	12727	20500
Tỷ lệ nồng độ đơn vị enzym/dịch thu hoạch	0,87	0,96	1,32	1,4

Cột trao đổi ion Q Sepharoza (Pharmacia) (3 L nhựa, Chiều cao = 20 cm, Đường kính = 14 cm) được điều chế. Mẫu rửa được thu gom cho thử nghiệm xác định độ pH, độ dẫn và nội độc tố (LAL). Cột được làm cân bằng với 5 thể tích cột của 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7,5. Dịch thu hoạch được lọc thẩm tách, được cô được nạp lên trên cột Q ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ. Cột được rửa bằng 5 thể tích cột của 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7,5 và 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,0. Protein được rửa giải với 10 mM Hepes, 400 mM NaCl, pH 7,0 và được lọc qua thiết bị lọc cuối cùng 0,22 µm vào túi vô trùng.

Sắc ký tương tác kỵ nước Phenyl-Sepharoza (Pharmacia) tiếp theo được thực hiện. Cột Phenyl-Sepharoza (PS) (9,1 L nhựa, Chiều cao = 29 cm, Đường kính = 20cm) được điều chế. Cột được làm cân bằng với 5 thể tích cột của 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat, 0,1 mM $CaCl_2$, pH 7,0. Nước giải hấp protein từ trên đây lần lượt được bổ sung các dung dịch gốc 2M amoni sulfat, 1 M kali phosphat và 1 M $CaCl_2$ đến nồng độ cuối cùng là 5 mM, 0,5 M và 0,1 mM. Protein được nạp lên trên cột PS ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ. 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat và 0,1 mM $CaCl_2$ pH 7,0 được bổ sung ở 100 cm/giờ. Dòng chảy qua được đi qua thiết bị lọc cuối cùng 0,22 µm vào túi vô trùng.

Protein được tinh chế PS được nạp lên trên cột aminophenyl boronat (ProMedics) (6,3 L nhựa, Chiều cao = 20 cm, Đường kính = 20cm) mà được làm cân bằng với 5 thể tích cột của 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat. Protein được đi qua cột ở tốc độ chảy 100 cm/giờ, và cột được rửa bằng 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat, pH 7,0. Sau đó, cột được rửa bằng 20 mM bixin, 100 mM NaCl,pH 9,0 và protein được rửa giải với 50 mM Hepes, 100 mM NaCl pH 6,9 thông qua thiết bị lọc vô trùng và vào túi vô trùng 20 L. Nước giải hấp được thử nghiệm về sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính enzym.

Cột hydroxyapatit (HAP) (BioRad) (1,6 L nhựa, Chiều cao = 10 cm, Đường kính = 14 cm) được làm cân bằng với 5 mM kali phosphat, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$ pH

7,0. Mẫu rửa được thu gom và được kiểm tra về độ pH, độ dẫn và nội độc tố (thử nghiệm LAL. Protein được tinh chế aminophenyl boronat được bổ sung kali phosphat và $CaCl_2$ để tạo thành nồng độ cuối cùng là 5 mM kali phosphat và 0,1 mM $CaCl_2$ và được nạp lên trên cột HAP ở tốc độ chảy 100 cm/giờ. Cột được rửa bằng 5 mM kali phosphat pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$, sau đó 10 mM kali phosphat pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$ pH. Protein được rửa giải với 70 mM kali phosphat pH 7,0 và được lọc qua thiết bị lọc 0,22 µm vào túi bảo quản vô trùng dung tích 5 L. Nước giải hấp được kiểm tra về sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính enzym.

Sau đó, protein được tinh chế HAP được bơm qua thiết bị lọc loại bỏ virut 20 nM thông qua thùng áp lực. Protein được bổ sung vào thùng áp lực và thiết bị lọc DV20 (Pall Corporation), đi qua thiết bị lọc Ultipor DV20 với lỗ 20 nm (Pall Corporation) vào túi bảo quản vô trùng dung tích 20 L. Dịch lọc được kiểm tra về nồng độ protein, hoạt tính enzym, đặc tính oligosacarit, monosacarit và axit sialic, và tạp chất có liên quan đến quy trình. Sau đó, protein trong dịch lọc được cô đến 1 mg/mL sử dụng hệ lọc dòng tiếp tuyến (TFF) Sartocon Slice ngưỡng khối lượng phân tử (MWCO) 10 kD (Sartorius). Thiết bị lọc đầu tiên được chuẩn bị bằng cách rửa với dung dịch Hepes/nước muối (10 mM Hepes, 130 mM NaCl, pH 7,0) và dịch thấm được lấy mẫu để kiểm tra độ pH và độ dẫn. Sau khi cô, protein được cô được lấy mẫu và được kiểm tra nồng độ protein và hoạt tính enzym. Tiến hành 6 lần trao đổi đệm trên protein được cô vào đệm cuối cùng: 10 mM Hepes, 130 mM NaCl, pH 7,0. Protein được cô được đi qua thiết bị lọc 0,22 µm vào túi bảo quản vô trùng dung tích 20 L. Protein được lấy mẫu và được kiểm tra nồng độ protein, hoạt tính enzym, nhóm sulfydryl tự do, đặc tính oligosacarit và độ thẩm thấu.

Bảng từ 20 đến 26 cung cấp số liệu theo dõi có liên quan đến mỗi trong số các bước tinh chế được nêu trên đây, đối với mỗi lô tế bào 3D35M.

Bảng 20. Số liệu cột Q Sepharoza

Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích nạp (mL)	10647	13524	12852	20418
Tỷ lệ thể tích nạp/thể tích nhựa	3,1	4,9	4,5	7,3
Thể tích cột (mL)	2770	3840	2850	2880

Thể tích nước giải hấp (mL)	6108	5923	5759	6284
Nồng độ protein của nước giải hấp (mg/mL)	2,8	3,05	2,80	2,86
Thử nghiệm enzym nước giải hấp (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Hiệu suất enzym (%)	65	107	87	76

Bảng 21. Số liệu cột Phenyl Sepharoza				
Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích trước khi bổ sung dung dịch gốc (mL)	5670	5015	5694	6251
Thể tích nạp (mL)	7599	6693	7631	8360
Thể tích cột (mL)	9106	9420	9340	9420
Tỷ lệ thể tích nạp/thể tích nhựa	0,8	0,71	0,82	0,89
Thể tích nước giải hấp (mL)	16144	18010	16960	17328
Nồng độ protein của nước giải hấp (mg/mL)	0,4	0,33	0,33	0,38
Thử nghiệm enzym nước giải hấp (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Hiệu suất protein (%)	41	40	36	37
Hiệu suất enzym (%)	102	88	82	96

Bảng 22. Số liệu cột Amino Phenyl Boronat				
Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích nạp (mL)	16136	17958	16931	17884
Tỷ lệ thể tích nạp/thể tích nhựa	2,99	3,15	3,08	2,98
Thể tích cột (mL)	5400	5700	5500	5300
Thể tích nước giải hấp (mL)	17595	22084	20686	19145
Nồng độ protein của nước giải hấp (mg/mL)	0,0	0,03	0,03	0,04
Nồng độ protein của nước giải hấp được lọc (mg/mL)	không được thử nghiệm	0,03	0,00	0,04
Thử nghiệm enzym nước giải hấp (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Hiệu suất protein (%)	0	11	11	12
Hiệu suất enzym (%)	không được xác định	41	40	69

Bảng 23. Số liệu cột hydroxyapatit				
Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích trước khi bổ sung dung dịch gốc (mL)	16345	20799	20640	19103
Tỷ lệ thể tích nạp/thể tích nhựa	10.95	13,58	14,19	12,81
Thể tích cột (mL)	1500	1540	1462	1500
Thể tích nạp (mL)	16429	20917	20746	19213
Thể tích nước giải hấp (mL)	4100	2415	1936	2419

Nồng độ protein của nước giải hấp (mg/mL)	không được thử nghiệm	0,24	0,17	0,23
Nồng độ protein của nước giải hấp được lọc (mg/mL)	NA	NA	0,17	NA
Thử nghiệm enzym nước giải hấp (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Hiệu suất protein (%)	Không được thử nghiệm	93	53	73
Hiệu suất enzym (%)	87	118	140	104

Bảng 24. Số liệu lọc DV20

Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích bắt đầu (mL)	4077	2233	1917	2419
Thể tích dịch lọc (mL)	4602	3334	2963	3504
Nồng độ protein của dịch lọc (mg/mL)	0,1	NA	0,09	NA
Nồng độ protein của nước giải hấp được lọc (mg/mL)	NA	0,15	0,09	0,16
Hiệu suất Protein (%)	không được thử nghiệm	93	82	101

Bảng 25. Số liệu nồng độ cuối cùng

Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích bắt đầu (mL)	4575	3298	2963	3492
Thể tích chất cô (mL)	562	407	237	316
Nồng độ protein của chất cô (mg/mL)	0,9	1,24	1,16	1,73
Hiệu suất protein (%)	111	102	103	98

Bảng 26. Số liệu về đệm trao đổi thành chế phẩm cuối				
Thông số	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Thể tích bắt đầu (mL)	562	407	237	316
Chất cô được trao đổi đệm thể tích cuối (mL)	594	516	3ten	554
Nồng độ protein của chất cô (mg/mL)	1,00	0,97	0,98	1,00
Nồng độ protein chất cô được lọc (mg/mL)	0,95	0,92	0,95	1,02
Hiệu suất protein (%)	118	99	110	101

Protein rHuPH20 có khả năng hòa tan được tinh chế và cô đặc được đổ đầy vô trùng vào các lọ vô trùng có thể tích nạp đầy là 5 mL và 1 mL. Protein được đưa qua bộ lọc 0,22 µm vào bơm điều khiển mà được dùng để đổ đầy lọ sử dụng màn hình phân tích trọng lượng. Các lọ được đóng kín bằng nút và được bảo vệ bằng nắp có rãnh. Các lọ được đóng được kiểm tra bằng mắt đối với các dị hạt và sau đó được đánh dấu. Sau khi dán nhãn, các lọ được làm lạnh nhanh bằng cách nhúng trong nitơ lỏng không nhiều hơn 1 phút và được bảo quản ở nhiệt độ ≤ -15°C (-20 ± 5°C).

Ví dụ 14

Tạo ra tế bào gen2 chứa PH20 tan được của người (rHuPH20)

Dòng tế bào gen1 3D35M được bộc lộ trong Ví dụ 13 được làm thích nghi với các mức methotrexat cao hơn để sản xuất dòng thế hệ 2 (Gen2). Tế bào 3D35M được gieo từ canh trường chứa methotrexat đã thiết lập vào môi trường CD CHO chứa 4mM GlutaMAX-1™ và 1,0 µM methotrexat. Tế bào được làm thích nghi với mức methotrexat cao hơn bằng cách cho chúng phát triển và chuyển trạng thái trong tủ nuôi ở 37 °C được làm ẩm với 7% CO_2 9 lần trong khoảng thời gian 46 ngày. Quần thể tế bào được khuếch đại được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn trong tấm nuôi cấy mô 96 giếng chứa môi trường có 2,0 µM methotrexat. Sau khoảng 4 tuần, các dòng được nhận diện và dòng 3E10B được chọn để mở rộng. Tế bào B 3E10 được sinh trưởng trong môi trường CD

CHO chứa 4 mM GlutaMAX-1™ và 2,0 μM methotrexat trong 20 lần chuyển hóa. Ngân hàng tế bào tốt (master cells bank - MCB) của dòng tế bào B 3E10 được tạo ra và làm lạnh băng và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Việc khuếch đại dòng tế bào được tiếp tục bằng cách nuôi cấy Tế bào B 3E10 trong môi trường CD CHO chứa 4 mM GlutaMAX-1™ và 4,0 μM methotrexat. Sau lần chuyển trạng thái thứ 12, tế bào được làm lạnh băng trong các lọ để làm ngân hàng tế bào tìm kiếm (research cells banks - RCB). Một lọ RCB được làm tan đông và được nuôI cấy trong môi trường chứa 8,0 μM methotrexat. Sau 5 ngày, hàm lượng methotrexat trong môi trường được tăng đến 16,0 μM, sau đó 20,0 μM sau 18 ngày. Tế bào từ lần chuyển trạng thái thứ 8 trong môi trường chứa 20,0 μM methotrexat được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn trong các tấm nuôi cấy mô 96 giếng chứa môi trường CD CHO có 4 mM GlutaMAX-1™ và 20,0 μM methotrexat. Các dòng được nhận diện 5 đến 6 tuần sau đó và dòng 2B2 được chọn để mở rộng trong môi trường chứa 20,0 μM methotrexat. Sau lần chuyển hóa thứ 11, tế bào 2B2 được làm lạnh đông trong lọ để làm ngân hàng tế bào tìm kiếm (RCB).

Tế bào 2B2 thu được là các tế bào DG44 CHO thiếu dihydrofolat reductaza (dhfr-) biểu hiện thể tái tổ hợp PH20 tan được của người (rHuPH20). PH20 tan được có mặt trong tế bào 2B2 với số lượng bản sao vào khoảng 206 bản sao/tế bào. Phân tích thẩm tách Southern của ADN bộ gen tế bào 2B2 được được phân giải bởi Spe I-, Xba I- và BamH I/Hind III sử dụng đoạn dò đặc hiệu rHuPH20 cho thấy đặc tính phân giải giới hạn như sau: một băng lai chính có kích thước ~7,7 kb và bốn băng lai nhỏ có kích thước (~13,9, ~6,6, ~5,7 và ~4,6 kb) với ADN được phân giải bằng Spe I; một băng lai chính có kích thước ~5,0 kb và hai băng lai nhỏ có kích thước (~13,9 và ~6,5 kb) với ADN được phân giải bằng Xba I; và một băng lai đơn có kích thước ~1,4 kb quan sát được sử dụng ADN 2B2 được phân giải bằng BamH I/Hind III. Phân tích trình tự của bản sao mARN chỉ ra rằng cADN (SEQ ID NO:139) thu được giống với trình tự tham khảo (SEQ ID NO:110) trừ một khác biệt cặp bazơ ở vị trí 1131, quan sát được là thymidin (T) thay cho xytosin (C) như mong muốn. Nguyên nhân là do đột biến câm, với không có ảnh hưởng nào đến trình tự axit amin.

Ví dụ 15

A. Sản xuất Gen2 tan được rHuPH20 trong thiết bị phản ứng sinh học canh trường tế bào 300 L

Lọ HZ24-2B2 được làm tan đông và được phát triển từ bình lắc qua bình lắc 36L trong môi trường CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) được bổ sung 20 μM methotrexat và GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Nói một cách ngắn gọn, lọ tế bào được làm tan đông trong bể nước 37°C, môi trường được bổ sung và tế bào được ly tâm. Tế bào được tái tạo huyền phù 125 mL bình tam giác lắc với 20 mL môi trường mới và được đặt trong tủ nuôi 37°C, 7% CO_2. Tế bào được phát triển lên 40 mL trong bình tam giác lắc 125 mL. Khi mật độ tế bào đạt đến lớn hơn 1,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc 125 mL trong 100 mL thể tích canh trường. Bình tam giác được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến lớn hơn 1,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc dung tích 250 mL trong 200 mL thể tích môi trường nuôi cấy, và bình tam giác được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2.Khi mật độ tế bào đạt đến hơn 1,5 x 10^6 tế bào/mL, dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc 1 L trong 800 mL thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến lớn hơn 1,5 x 10^6 tế bào/mL dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc 6 L trong 5000 mL thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2. Khi mật độ tế bào đạt đến hơn 1,5 x 10^6 tế bào/mL dịch nuôi cấy được phát triển trong bình lắc 36 L trong 32 L thể tích môi trường nuôi cấy và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 7% CO_2.

Thiết bị phản ứng 400 L được vô trùng và 230 mL môi trường CD-CHO được bổ sung. Trước khi sử dụng, thiết bị phản ứng được kiểm tra về sự nhiễm tạp. Khoảng 30 L tế bào được chuyển từ bình lắc 36L sang thiết bị phản ứng sinh học 400 L (Braun) ở mật độ cấy nhiễm là 4,0 x 10^5 tế bào sống sót cho mỗi mL và tổng thể tích là 260L. Các thông số là điểm cài đặt nhiệt độ, 37°C; tốc độ cánh 40-55 vòng/phút; áp suất bình: 3 psi; rảy khí 0,5- 1,5 L/phút.; phủ khí: 3 L/phút. Thiết bị phản ứng được lấy mẫu hàng ngày để đếm tế bào, kiểm tra pH, phân tích môi trường, sản xuất và duy trì protein. Ngoài ra, trong quá trình vận hành, nguồn cấp chất dinh dưỡng được bổ sung. Khi được 120 giờ (ngày thứ 5), 10,4L môi trường cấp liệu số 1 (4x CD-CHO + 33 g/L Glucoza + 160 mL/L Glutamax-1™ + 83 mL/L Yeastolat + 33 mg/L rHuInsulin) được bổ sung. Khi được 168 giờ (ngày 7), 10,8 L môi trường cấp liệu số (2x CD-CHO + 33 g/L Glucoza + 80 mL/L

Glutamax-1™ + 167 mL/L Yeastolat + 0,92 g/L Natri Butyrat) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 36,5°C. Khi được 216 giờ (ngày 9), 10,8 L môi trường cấp liệu số 3 (1x CD-CHO + 50 g/L Glucoza + 50 mL/L Glutamax-1™ + 250 mL/L Yeastolat + 1,80 g/L Natri Butyrat) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 36°C. Khi được 264 giờ (ngày 11), 10,8 L môi trường cấp liệu số 4 (1x CD-CHO + 33 g/L Glucoza + 33 mL/L Glutamax-1™ + 250 mL/L Yeastolat + 0,92 g/L Natri Butyrat) được bổ sung, và nhiệt độ nuôi cấy được chuyển thành 35,5 °C. Môi trường cấp dưỡng bổ sung được thấy là làm tăng dần sự sản xuất rHuPH20 tan được trong giai đoạn sản xuất cuối cùng. Thiết bị phản ứng được thu hoạch ở ngày 14 hoặc 15 hoặc khi khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 40%. Quy trình này tạo ra năng suất cuối cùng là 17 000 đơn vị cho mỗi mL với mật độ tế bào cực đại là 12 triệu tế bào/mL. Tại thời điểm thu hoạch, canh trường được lấy mẫu để phát hiện vi khuẩn mycoplasma, gánh nặng sinh học, nội độc tố và virut *in vitro* và *in vivo*, kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy - TEM) và hoạt tính enzym.

Canh trường được bơm bằng bơm nhu động qua hệ thống lọc bốn môđun Millistak (Millipore) song song, mỗi môđun chứa lớp đất có nhiều tảo cát được xếp từ 4 đến 8 µm và lớp đất có nhiều tảo cát được xếp từ 1,4 đến 1,1 µm, sau đó là màng xenluloza, then qua hệ thống lọc đơn Millistak thứ hai (Millipore) chứa lớp đất có nhiều tảo cát được xếp từ 0,4 đến 0,11 µm và lớp đất có nhiều tảo cát được xếp từ < 0,1 µm, sau đó là màng xenluloza, và sau đó qua 0,22 µm bộ lọc cuối vào túi dẻo sử dụng một lần vô trùng có dung tích 350 L. Dịch nuôi cấy tế bào được thu hoạch được bổ sung 10 mM EDTA và 10 mM Tris đến pH 7,5. Canh trường được cô 10 lần bằng thiết bị lọc tiếp tuyến (tangential flow filtration - TFF) sử dụng bốn Sartoslice TFF, thiết bị lọc polyete sulfon (PES) giới hạn khối lượng phân tử 30 kDa (MWCO) (Sartorious), sau đó là 10 lần trao đổi đệm với 10 mM Tris, 20mM Na_2SO_4, pH 7,5 trong 0,22 µm thiết bị lọc cuối trong túi bảo quản vô trùng dung tích 50 L.

Sản phẩm thu hoạch được cô, được lọc kép được vô hoạt đối với virut. Trước khi vô hoạt virut, dung dịch bao gồm 10% Triton® X-100, 3% tri (n-butyl) phosphat (TNBP) được điều chế. Sản phẩm thu hoạch được cô, được lọc kép được cho tiếp xúc với 1% Triton® X-100, 0,3% TNBP trong 1 giờ trong bình phản ứng thủy tinh 36 L ngay trước khi tinh chế trên cột Q.

B. Tinh chế rHuPH20 tan được Gen2

Cột trao đổi ion Q Sepharoza (Pharmacia) (9 L nhựa, H= 29 cm, D= 20 cm) được chuẩn bị. Mẫu rửa được thu gom để xác định pH, độ dẫn và phân tích nội độc tố (LAL). Cột được làm cân bằng với 5 thể tích cột bao gồm 10 mM Tris, 20 mM Na2SO4, pH 7,5. Sau khi vô hoạt virut, sản phẩm thu hoạch được cô, được lọc kép được nạp lên cột Q ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ. Rửa cột với 5 thể tích cột bao gồm 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7,5 và 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,0. Protein được rửa giải với 10 mM Hepes, 400 mM NaCl, pH 7,0 vào bộ lọc cuối 0,22 µm trong túi vô trùng. Mộu rửa giải được kiểm tra sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính hyaluronidaza. Số ghi độ hấp thụ A_{280} được đọc lúc bắt đầu và kết thúc trao đổi.

Tiếp theo, sắc ký tương tác kỵ nước Phenyl-Sepharoza (Pharmacia) được tiến hành. Cột Phenyl-Speharose (PS) (19-21 L nhựa, H=29 cm, D= 30 cm) được điều chế. Sản phẩm rửa được thu gom và được lấy mẫu để đo pH, độ dẫn và nội độc tố (phân tích LAL). Cột được làm cân bằng với 5 thể tích cột bao gồm 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat, 0,1 mM $CaCl_2$, pH 7,0. Rửa giải protein từ cột Q Sepharoza được bổ sung 2M amoni sulfat, 1 M kali phosphat và 1 M $CaCl_2$ dung dịch gốc để tạo thành nồng độ cuối cùng lần lượt là 5 mM, 0,5 M và 0,1 mM. Protein được nạp lên PS cột ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ và dòng chảy qua cột được thu gom. Cột được rửa với 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat và 0,1 mM $CaCl_2$ pH 7,0 ở 100 cm/giờ và sản phẩm rửa được bổ sung vào dòng chảy qua được thu gom. Được kết hợp với sản phẩm rửa cột, dòng chảy qua được đưa qua bộ lọc cuối 0,22 µm vào túi vô trùng. Dòng chảy qua được lấy mẫu để xác định sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính enzym.

Cột aminophenyl boronat (Prometics) được chuẩn bị. Sản phẩm rửa được thu gom và lấy mẫu để xác định pH, độ dẫn và nội độc tố (phân tích LAL). Cột được làm cân bằng với 5 thể tích cột bao gồm 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat. Dòng PS chảy qua chứa protein được tinh chế được nạp lên cột aminophenyl boronat ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ. Cột được rửa với 5 mM kali phosphat, 0,5 M amoni sulfat, pH 7,0. Cột được rửa với 20 mM bixin, 0,5 M amoni sulfat, pH 9,0. Cột được rửa với 20 mM bixin, 100 mM natri clorua, pH 9,0. Protein được rửa giải với 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 6,9 và được đưa qua bộ lọc vô trùng vào túi vô trùng. Mẫu rửa giải được kiểm tra sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính enzym.

Cột hydroxyapatit (HAP) (Biorad) được chuẩn bị. Sản phẩm rửa được thu gom và được kiểm tra độ pH, độ dẫn và nội độc tố (phân tích LAL). Cột được làm cân bằng với 5 mM kali phosphat, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$, pH 7,0. Protein được tinh chế aminophenyl boronat được bổ sung đến nồng độ cuối là 5 mM kali phosphat và 0,1 mM $CaCl_2$ và được nạp lên cột HAP ở tốc độ chảy là 100 cm/giờ. Cột được rửa với 5 mM kali phosphat, pH 7, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$. Sau đó, cột được rửa với 10 mM kali phosphat, pH 7, 100 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$. Protein được rửa giải với 70 mM kali phosphat, pH 7,0 và được đưa qua 0,22µm bộ lọc vô trùng vào túi vô trùng. Mẫu rửa giải được kiểm tra sự nhiễm tạp vi sinh vật, nồng độ protein và hoạt tính enzym.

Sau đó, protein được tinh chế HAP được đưa qua thiết bị lọc virut. Thiết bị lọc Viosart được làm vô trùng (Sartorius) trước tiên được điều chế bằng cách rửa với 2 L kali phosphat 70 mM, pH 7,0. Trước khi sử dụng, đệm được lọc được lấy mẫu để kiểm tra pH và độ dẫn. Protein được tinh chế HAP được bơm qua bơm nhu động qua thiết bị lọc loại virut 20 nM. Protein được lọc trong 70 mM kali phosphat, pH 7,0 được đưa qua thiết bị lọc cuối 0,22 µm vào túi vô trùng. Mẫu được lọc virut được kiểm tra đặc tính nồng độ protein, hoạt tính enzym, oligosacarit, monosacarit và axit sialic. Mẫu cũng được kiểm tra để xử lý các tạp chất có liên quan.

Protein trong thiết bị lọc sau đó được cô đến 10 mg/mL sử dụng hệ thống lọc dòng tiếp tuyến Sartocon Slice (TFF) giới hạn khối lượng phân tử 10 kD (MWCO) (Sartorius). Thiết bị lọc trước tiên được điều chế bằng cách rửa với 10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6,0 và chất thấm được lấy mẫu để kiểm tra độ pH và tính dẫn. Sau khi cô đặc, protein được cô đặc được lấy mẫu và kiểm tra nồng độ protein và hoạt tính enzym. Tiến hành 6 lần trao đổi đệm trên protein đã cô đặc vào đệm cuối: 10 mM histidin, 130 mM NaCl, pH 6,0. Sau khi trao đổi đệm, protein đã cô đặc được đưa qua thiết bị lọc 0,22 µm vào túi bảo quản vô trùng 20 L. Protein được lấy mẫu và được kiểm tra đặc tính nồng độ protein, hoạt tính enzym, nhóm sulfydryl tự do, oligosacarit và độ thẩm thấu.

Cụm protein được lọc vô trùng sau đó được phân tán vô trùng ở 20 mL vào lọ vô trùng Teflon 30 mL (Nalgene). Các lọ này sau đó được làm lạnh nhanh và được bảo quản ở -20 ± 5°C.

C.So sánh quá trình sản xuất và tinh chế rHuPH20 tan được Gen1 và rHuPH20 tan được Gen2

Quá trình sản xuất và tinh chế rHuPH20 tan được Gen2 trong canh trường tế bào thiết bị phản ứng sinh học 300L chứa một vài thay đổi về quy trình so với quá trình sản xuất và tinh chế rHuPH20 tan được Gen1 trong dịch nuôi cấy tế bào thiết bị phản ứng sinh học 100L (được bộc lộ trong Ví dụ 13B). Bảng 27 đưa ra các khác biệt mẫu, ngoài các thay đổi quy mô lớn, giữa các phương pháp.

Bảng 27.

Sự khác biệt về quy trình	rHuPH20 tan được Gen1	rHuPH20 tan được Gen2
Dòng tế bào	3D35M	2B2
Môi trường được sử dụng để phát triển nguyên liệu cấy tế bào	Chứa 0,10 µM methotrexat (0,045 mg/L)	Chứa 20 µM methotrexat (9 mg/L)
Môi trường chứa 6L canh trường trở lên	Chứa 0,10 µM methotrexat	Không chứa methotrexat
bình lắc 36 L	Không có dụng cụ Thể tích vận hành 20 L.	được cung cấp dụng cụ giám sát và khống chế pH, oxy hòa tan, vảy nước và tốc độ chảy khí phủ. Thể tích vận hành 32 L
Thể tích vận hành cuối trong thiết bị phản ứng sinh học	Khoảng 100 L trong thiết bị phản ứng sinh học 125 L (thể tích môi trường nuôi cấy ban đầu + 65 L)	Khoảng 300L trong thiết bị phản ứng sinh học 400L (thể tích môi trường nuôi cấy ban đầu + 260L)
Môi trường nuôi cấy trong thiết bị phản ứng sinh học cuối	Không rHuInsulin	5,0 mg/L rHuInsulin
Thể tích cấp liệu môi trường	Được định ở mức 4% thể tích dịch nuôi cấy tế bào trong thiết bị phản ứng sinh học tức là 3,4, 3,5 và 3,7 L, dẫn đến thể thiết bị phản ứng sinh học đích là ~92 L.	Được định ở mức 4% thể tích dịch nuôi cấy tế bào trong thiết bị phản ứng sinh học tức là 10,4, 10,8, 11,2 và 11,7 L, dẫn đến thể thiết bị phản ứng sinh học đích là ~303L.

Môi trường cấp dưỡng	Môi trường cấp dưỡng #1: CD CHO + 50 g/L Glucoza + 8mM GlutaMAX™-1 Môi trường cấp dưỡng #2 (CD CHO + 50 g/L Glucoza + 8 mM GlutaMAX + 1,1 g/L Natri Butyrat Môi trường cấp dưỡng #3: CD CHO + 50 g/L Glucoza + 8 mM GlutaMAX + 1,1 g/L Natri Butyrat	Môi trường cấp dưỡng #1: 4x CD CHO + 33 g/L Glucoza + 32 mM Glutamax + 16,6 g/L Yeastolat + 33 mg/L rHuInsulin Môi trường cấp dưỡng #2: 2x CD CHO + 33 g/L Glucoza + 16 mM Glutamax + 33,4 g/L Yeastolat + 0,92 g/L Natri Butyrat Môi trường cấp dưỡng #3: 1x CD CHO + 50 g/L Glucoza + 10 mM Glutamax + 50 g/L Yeastolat + 1,80 g/L Natri Butyrat Môi trường cấp dưỡng #4:1x CD CHO + 33 g/L Glucoza + 6,6 mM Glutamax + 50 g/L Yeastolat + 0,92 g/L Natri Butyrat
Lọc dịch nuôi cấy tế bào trong thiết bị phản ứng sinh học	4 lần lọc polyetesulfon liên tiếp (8,0µm, 0,65µm, 0,22µm và 0,22µm)	
Cô đặc và trao đổi đệm trước khi sắc ký	Cô đặc với 2 TFF bằng thiết bị lọc polyeteulfon 30K MWCO xoắn vi lỗ Trao đổi đệm chất cô 6 lần với 10 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7,0 Túi bảo quản vô trùng 20L	Cô đặc sử dụng bốn thiết bị lọc Sartorius Sartoslice TFF 30K MWCO Trao đổi đệm chất cô 10 lần với 10 mM Tris, 20 mM Na_2SO_4, pH 7,5 Túi bảo quản vô trùng 50L
Vô hoạt virut trước khi sắc ký	Không	Vô hoạt virut được tiến hành với sự bổ sung 1% Triton® X-100, 0,3% Tributyl Phosphat, pH 7,5,

Bước tinh chế thứ nhất (Q Sepharoza)	Không đọc sự hấp thụ	Số liệu đo được A280 khi bắt đầu và kết thúc
Lọc virut sau khi sắc ký	Thiết bị lọc Pall DV-20 (20 nm)	Thiết bị lọc Sartorius Virosart (20 nm)
Hàm lượng và trao đổi đệm sau khi sắc ký	Đệm Hepes/nước muối pH 7,0 Protein được cô đặc đến 1 mg/ml	Đệm histidin/nước muối, pH 6,0 Protein được cô đặc đến 10 mg/ml

Ví dụ 16

Xác định hàm lượng axit xialic và monosacarit

Hàm lượng axit sialic và monosacarit của rHuPH20 tan được có thể được đánh giá bằng sắc ký lỏng đảo pha (RPLC) sau đó thủy phân với axit trifloaxetic. Trong một ví dụ, hàm lượng axit xialic và monosacarit của hyaluronidaza được tinh chế lô số HUB0701E (1,2 mg/mL; được sản xuất và được tinh chế về cơ bản như được nêu trong Ví dụ 15) được xác định. Nói một cách ngắn gọn, 100 µg mẫu được thủy phân với 40 % (theo thể tích) axit trifloaxetic ở 100°C trong 4 giờ trong hai mẫu. Sau khi thủy phân, mẫu được làm khô và tái tạo huyền phù trong 300 µL nước. 45 µL từ mỗi mẫu tái tạo huyền phù được chuyển tới ống mới và làm khô, và 10 µL của 10 mg/mL dung dịch natri axetat được bổ sung vào mỗi mẫu. Các monosacarit được giải phóng được đánh dấu huỳnh quang bằng cách bổ sung 50 µL dung dịch chứa 30 mg/mL axit 2-aminobenzoic, 20 mg/mL natri xyanoborohydrit, khoảng 40 mg/mL natri axetat và 20 mg/mL axit boric trong metanol. Hỗn hợp được ủ trong 30 phút ở 80°C trong bóng tối. Phản ứng tạo dẫn xuất được làm ngừng bằng cách bổ sung 440 µL pha động A (0,2% (theo thể tích) n-butylamin, 0,5% (theo thể tích) axit phosphoric, 1% (theo thể tích) tetrahydrofuran). Thể trống cơ chất của nước cũng được thủy phân và tạo dẫn xuất như được nêu cho mẫu hyaluronidaza làm đối chứng âm tính. Các monosacarit đã giải phóng được phân tách bằng RPLC sử dụng cột đảo pha Octadecyl (C_{18}) (4,6 x 250 mm, kích thước hạt 5 µm; J.T. Baker) và được theo dõi bằng cách phát hiện sự phát huỳnh quang (bước sóng kích thích 360 nm, bước sóng phát 425 nm). Việc định lượng hàm lượng của monosacarit được thực hiện bằng cách so sánh sắc phổ từ mẫu hyaluronidaza sắc phổ của monosacarit

chuẩn bao gồm*N*-D-glucosamin (GlcN), *N*-D-galactosamin (GalN), galactoza, fucoza và manoza. Bảng 28 biểu diễn tỷ lệ mol của mỗi monosacarit với mỗi phân tử hyaluronidaza.

Bảng 28. hàm lượng monosacarit của rHuPH20 tan được

Lô	Bản sao	GlcN	GalN	Galactoza	Manoza	Fucoza
HUB0701E	1	14,28	0,07*	6,19	25,28	2,69
	2	13,66	0,08*	6,00	24,34	2,61
	Trung bình	13,97	0,08*	6.10	24,81	2,65

* Kết quả GalN giới hạn sự phát hiện dưới đây

Ví dụ 17

Tính không đồng nhất của rHuPH20 tan được đầu cùng C từ tế bào 3D35M và 2B2

Việc lập trình tự đầu cùng C được tiến hành trên hai lô của sHuPH20 được tạo ra và được tinh chế từ tế bào 3D35M trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 100 L (Lô HUA0505MA) và tế bào 2B2 trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 300L (Lô HUB0701EB). Các lô được cắt riêng rẽ bằng endoproteinaza Asp-N, phân cắt cụ thể các liên kết peptit đầu cùng N ở axit aspartic và axit xysteic. Sự phân cắt này giải phóng phần đầu cùng C của rHuPH20 tan được ở axit aspartic ở vị trí 431 của SEQ ID NO:122. Đoạn đầu cùng C được tách và được mô tả để xác định trình tự và sự dư thừa mỗi quần thể trong lô HUA0505MA và lô HUB0701EB.

Được quan sát thấy rằng các chế phẩm rHuPH20 tan được từ tế bào 3D35M và tế bào 2B2 được bộc lộ tính không đồng nhất, và chứa các polypeptit khác nhau trong trình tự đầu cùng C (Bảng 30 và 31). Tính không đồng nhất này có thể là kết quả của việc phân cắt đầu cùng C của polypeptit axit amin 447 được biểu hiện (SEQ ID NO:122) bởi các peptidaza có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các dung dịch khác trong quá trình sản xuất và tinh chế. Polypeptit trong chế phẩm rHuPH20 tan được có trình tự axit amin tương ứng với axit amin 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 và 1-443 của trình tự rHuPH20 tan được được nêu trong SEQ ID NO:122. Trình tự axit amin đầy đủ của mỗi trong số các polypeptit này được đưa ra trong SEQ ID NO: 122 đến 126, theo thứ tự. Như được

lưu ý trong Bảng 29 và 30, sự dư thừa mỗi polypeptit trong chế phẩm rHuPH20 tan được từ tế bào 3D35M và tế bào 2B2 khác.

Bảng 29. Phân tích đoạn đầu cùng C từ lô HUA0505MA

Đoạn	Vị trí axit amin (so với SEQ ID NO: 122)	Trình tự	Khối lượng lý thuyết	Khối lượng thực nghiệm	Lỗi	Thời gian rửa giải	Sự dư thừa
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEP QIFY (SEQ ID NO:191)	2053,97	2054,42	0,45	99,87	0,2%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEP QIF (SEQ ID NO:192)	1890,91	1891,28	0,37	97,02	18,4%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEP QI (SEQ ID NO:193)	1743,84	1744,17	0,33	86,4	11,8%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEP Q (SEQ ID NO:194)	1630,70	1631,07	0,32	74,15	56,1%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502,70	1502,98	0,28	77,36	13,6%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

Bảng 30. Phân tích đoạn đầu cùng C từ lô HUB0701EB

Đoạn	Vị trí axit amin (so với SEQ ID NO: 122)	Trình tự	Khối lượng lý thuyết	Khối lượng thực nghiệm	Lỗi	Thời gian rửa giải	Sự dư thừa
D28a	431-447	DAFKLPPMETE EPQIFY (SEQ ID NO:191)	2053,97	2054,42	0,45	99,89	1,9%

D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:192)	1890,91	1891,36	0,45	96,92	46,7%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:193)	1743,84	1744,24	0,40	85,98	16,7%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:194)	1630,70	1631,14	0,39	73,9	27,8%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502,70	1503,03	0,33	77,02	6,9%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405,64	ND	N/A	N/A	0,0%

Vì các cải biến sẽ là rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, sáng chế được giới hạn chỉ trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được, trong đó:

hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được hoạt động trung tính, tan được; và

bao gồm trình tự bất kỳ của các gốc axit amin trong SEQ NO: 107 mà kết thúc tại gốc 469, 470 hoặc 471 của SEQ ID NO: 107.

2. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được mà được chọn trong số:

polypeptit mà chứa sự thế axit amin hoặc các sự thế axit amin trong trình tự của các axit amin được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO: 107 mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 95% với trình tự của các axit amin được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO: 107, trong đó:

trình tự axit amin của polypeptit được thế axit amin khác với trình tự của các axit amin được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO: 107 chỉ bởi sự thế axit amin;

polypeptit này là tan được; và

polypeptit này có hoạt tính hyaluronidaza.

3. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm 1 hoặc điểm 2 mà được N-glycosyl hóa.

4. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm 3, trong đó polypeptit được N-glycosyl hóa bao gồm gốc N-axetylglucosamin được liên kết với mỗi gốc trong số ít nhất ba gốc asparagin (N) được chọn từ trong số các gốc axit amin N82, N166, N235, N254, N368 và N393 của SEQ ID NO:107.

5. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm 4, trong đó ba gốc asparagin là các gốc axit amin 235, 368 và 393 của SEQ ID NO: 107.

6. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm 2 mà là polypeptit chứa sự thế axit amin hoặc các sự thế axit amin trong trình tự axit amin được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO:107, nhờ vậy polypeptit được thế axit amin gồm

trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 98% với trình tự axit amin tương ứng được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO:107.

7. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan bao gồm trình tự axit amin được nêu là các axit amin 36-469, 36-470 hoặc 36-471 của SEQ ID NO: 107.

8. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 mà được cải biến bởi sự cải biến được chọn trong số sialyl hóa, albumin hóa, farnesyl hóa, carboxyl hóa, hydroxyl hóa và phosphoryl hóa.

9. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 mà được cải biến bởi polyme.

10. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm 9, trong đó polyme này là dextran hoặc PEG.

11. Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 mà về cơ bản tinh khiết.

12. Thể liên hợp, bao gồm gốc được liên hợp được liên kết trực tiếp hoặc qua cầu nối với đầu cùng C hoặc đầu cùng N của hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

13. Thể liên hợp theo điểm 12, trong đó hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được này được liên hợp với gốc được chọn từ trong số miền multime hóa, độc tố, chất đánh dấu phát hiện được hoặc dược chất.

14. Thể liên hợp theo điểm 13, trong đó hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được này được liên hợp với miền Fc.

15. Chế phẩm, chứa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

16. Axit nucleic, mã hóa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó phân tử axit nucleic không mã hóa hyaluronidaza PH20 có chiều dài đầy đủ nhưng mã hóa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt.

17. Vectơ biểu hiện, chứa polynucleotit mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó trình tự nucleotit bao gồm hoặc ngay sau codon kết thúc được chèn theo cách điều khiển

được vào vectơ để biểu hiện hyaluronidaza PH20 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

18. Vectơ theo điểm 17 là vectơ virut.

```
PH20 người      MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
PH20 tinh tinh  MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFC 60
                ************************************************************

PH20 người      LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
PH20 tinh tinh  LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
                ********************.***.******************************

PH20 người      QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
PH20 tinh tinh  QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS 180
                ************************************************************

PH20 người      LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
PH20 tinh tinh  LTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN 240
                ************************************************************

PH20 người      VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV 300
PH20 tinh tinh  VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPV 300
                ****************************************.*******************

PH20 người      FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
PH20 tinh tinh  FVYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
                *.************************************************************

PH20 người      ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
PH20 tinh tinh  ILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK 420
                ************************************************************

PH20 người      PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI 480
PH20 tinh tinh  PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQI 480
                ************************************************************.**

PH20 người      FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISSVASL 509
PH20 tinh tinh  FYNASPSTLSATMFIDLCDLYLVPTSYLIL 510
                *************** :. *:*: :*   *
```

FIG. 1

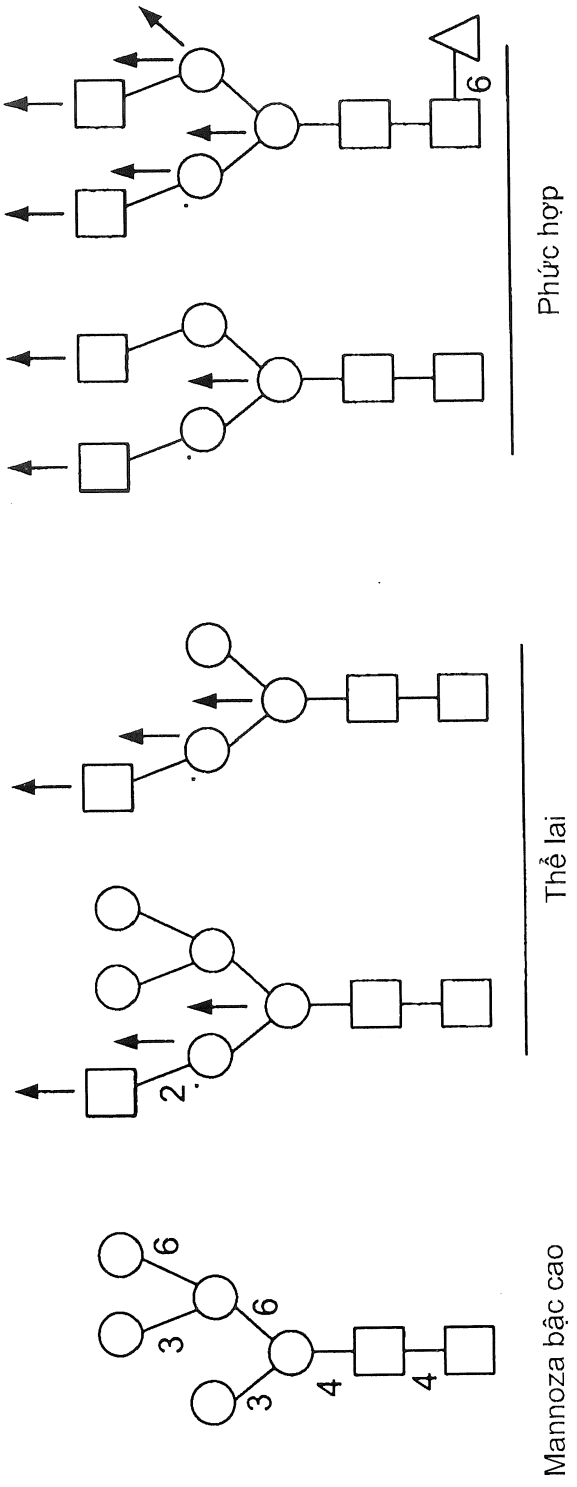

Phức hợp
Thể lai
Mannoza bậc cao
N-axetylglucosamin
Mannoza
Fucoza
6
2
3
6
3
6
4
4

FIG. 2

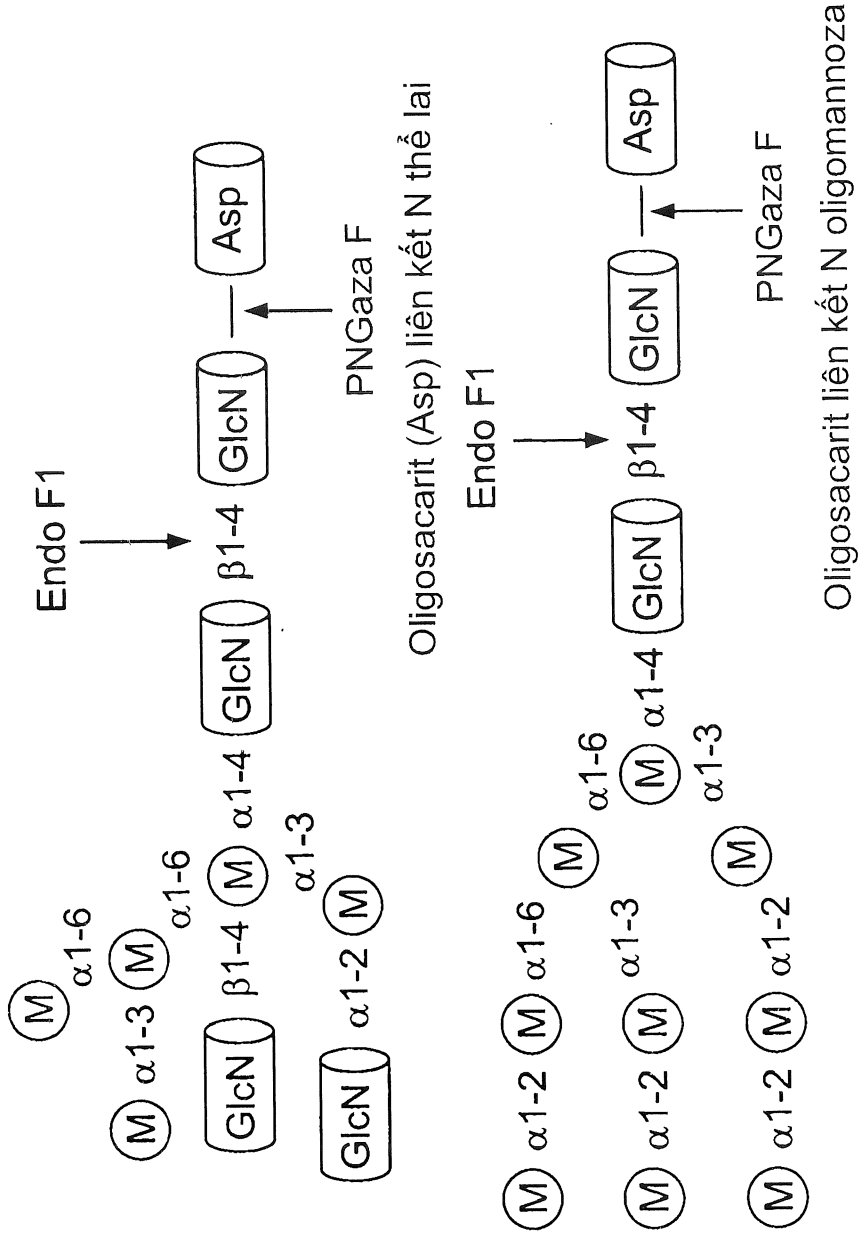

Endo F1
M α1-6
M α1-3 M α1-6
GlcN β1-4 M α1-4 GlcN β1-4 GlcN — Asp
GlcN α1-2 M α1-3
PNGaza F
Oligosacarit (Asp) liên kết N thể lai
Endo F1
M α1-2 M α1-6 M α1-6
M α1-2 M α1-3 M α1-4 GlcN β1-4 GlcN — Asp
M α1-2 M α1-3
PNGaza F
Oligosacarit liên kết N oligomannoza

FIG. 3A

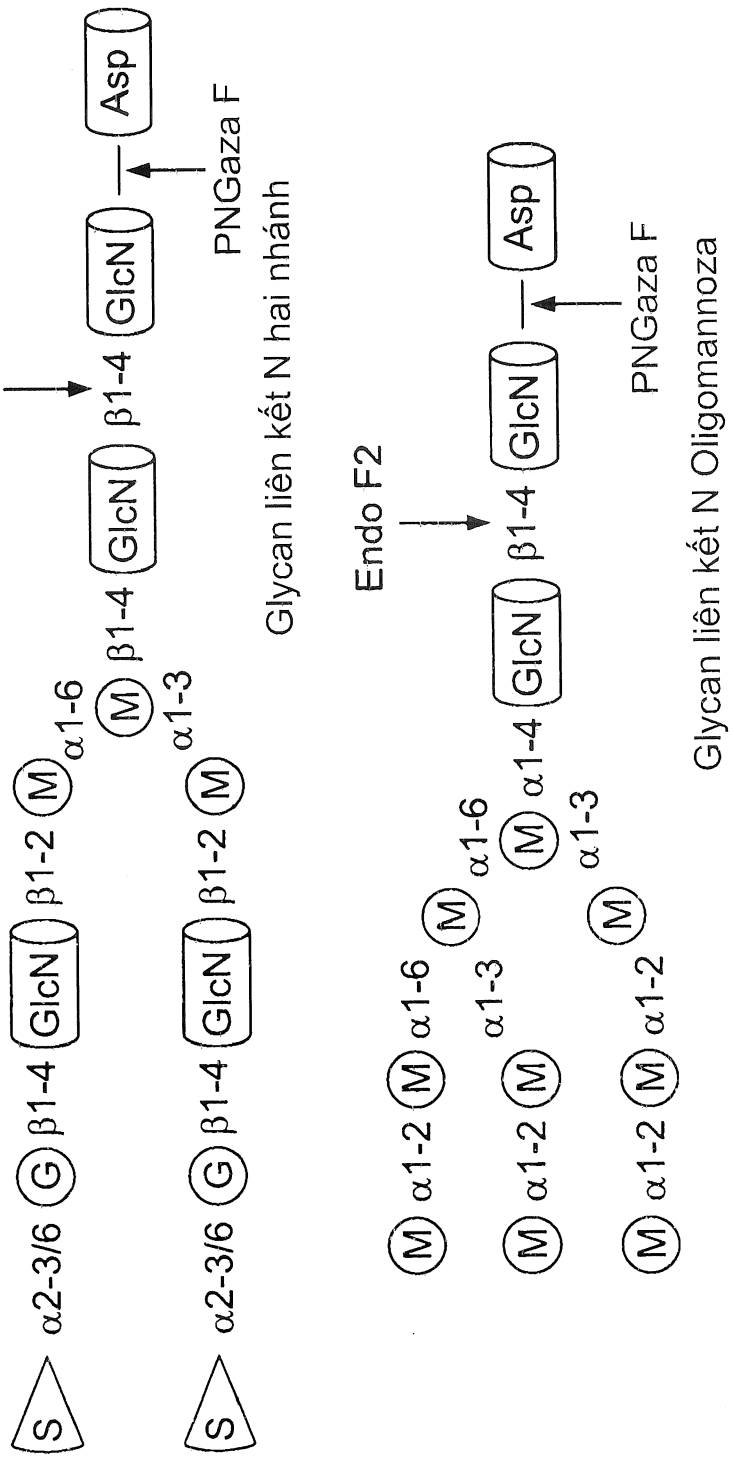

Endo F2
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
α1-6
M
β1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
PNGaza F
Glycan liên kết N hai nhánh
α1-3
Endo F2
M
α1-2
M
α1-6
M
α1-3
M
α1-2
M
α1-6
M
α1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
PNGaza F
Glycan liên kết N Oligomannoza
α1-3
M
α1-2
M

FIG. 3B

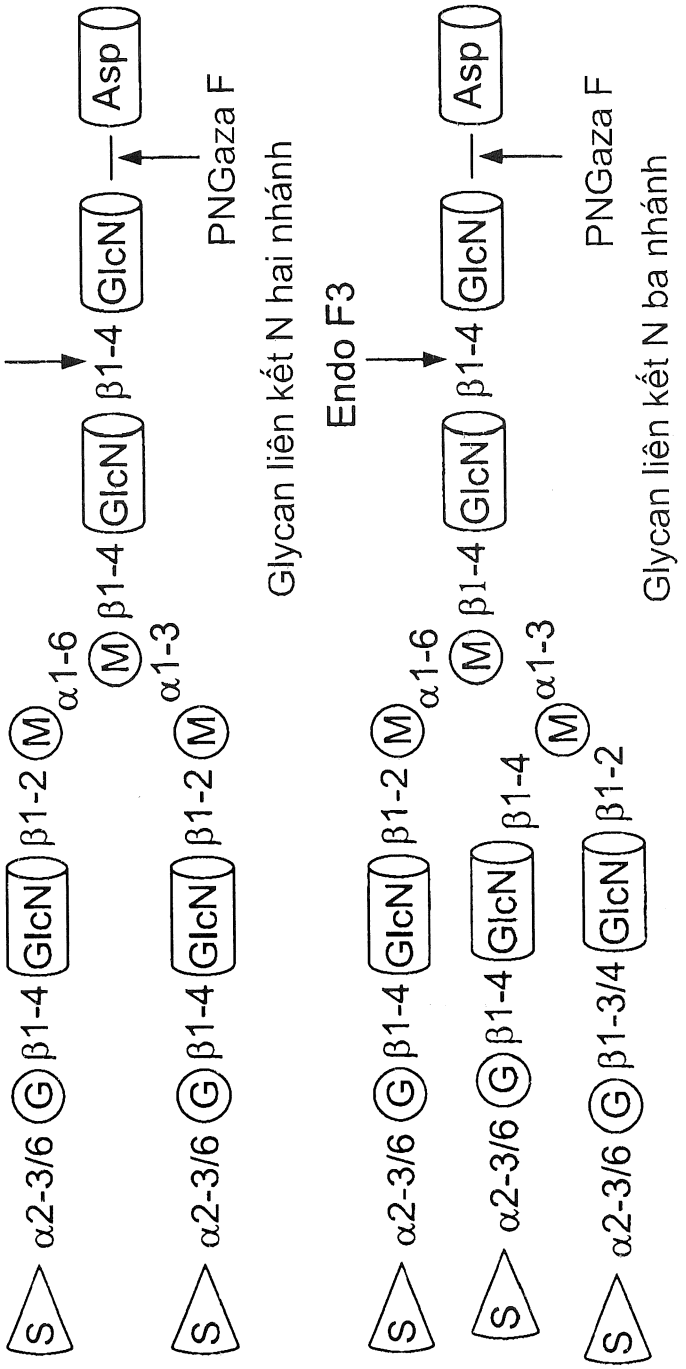

Endo F3
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
α1-6
M
β1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
PNGaza F
Glycan liên kết N hai nhánh
Endo F3
S
α2-3/6
G
β1-4
GlcN
β1-2
M
α1-6
M
β1-4
GlcN
β1-4
GlcN
Asp
PNGaza F
Glycan liên kết N ba nhánh

FIG. 3C

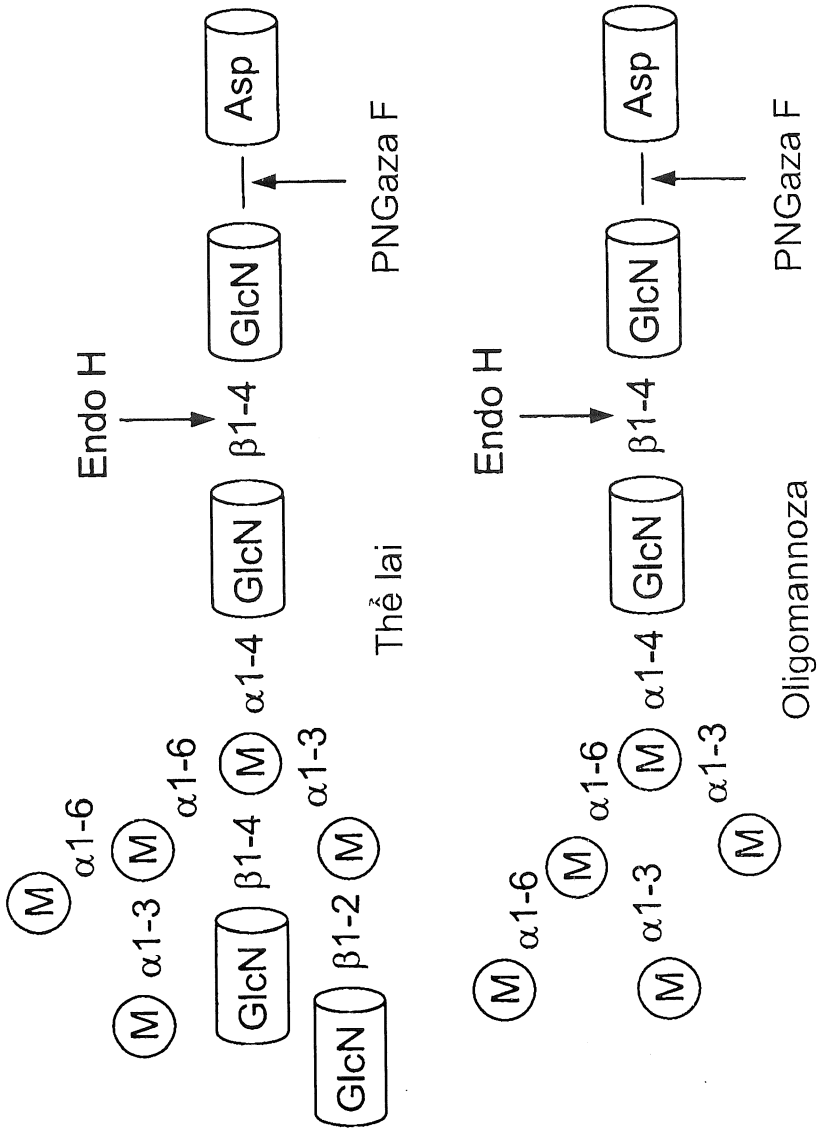

Endo H
PNGaza F
Thể lai
Oligomannoza
M
α1-6
α1-3
β1-4
α1-4
β1-2
GlcN
Asp

FIG. 3D

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> Hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được và chế phẩm chứa hyaluronidaza PH20 bị cắt cụt tan được này

<130> 3800020.00246/3074PC

<140> Chưa được chuyển nhượng
<141> Kèm theo đây

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

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

<160> 215

<170> FastSEQ cho Windows Phiên bản 4.0

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

<220>
<223> cADN PH20 người mã hóa các axit amin 1-509

<400> 1
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320

ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctacaatg cttcaccctc cacactatct gccacaatgt tcattgttag tattttgttt 1500
cttatcattt cttctgtagc gagtttgtaa 1530

<210> 2
<211> 1506
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20 được tối ưu hóa codon với các vị trí giới hạn

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-507

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-505

<400> 4

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

385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser
500 505

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-503

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-501

```
<400> 6
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1                  5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
```

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-499

<400> 7

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-497

<400> 8

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

305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495
Ser

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-495

<400> 9
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-493

<400> 10

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

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

<210> 11

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-491

<400> 11

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-489

<400> 12

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-490

<400> 13

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-487

<400> 14

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-485

<400> 15

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

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

<210> 16
<211> 484
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-484

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 483
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-483

<400> 17

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-482

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 481
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-481

<400> 19

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-480

<400> 20

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

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

<210> 21
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-479

<400> 21

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

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

<210> 22
<211> 478
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-478

<400> 22

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

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

<210> 23

<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-477

<400> 23

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

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

<210> 24
<211> 476
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-476

<400> 24

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

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

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

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-475

<400> 25

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

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

<210> 26
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-474

<400> 26

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

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

<210> 27
<211> 473
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-473

<400> 27

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

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met
465 470

<210> 28
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-472

<400> 28
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu

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

<210> 29
<211> 471
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-471

<400> 29

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

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

<210> 30
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-470

<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-469

<400> 31

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

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

<210> 32
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-468

<400> 32
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

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

<210> 33
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-467

<400> 33
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285

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

<210> 34
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-466

```
<400> 34
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
```

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

<210> 35
<211> 465
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-465

<400> 35

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

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

<210> 36
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 tiền chất 1-464

<400> 36

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

```
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
```

<210> 37
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-462

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 460
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-460

```
<400> 38
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
```

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

<210> 39
<211> 458
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-458

<400> 39

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

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

<210> 40
<211> 456
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-456

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

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

<210> 41
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-454

<400> 41

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

<210> 42
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-452

<400> 42
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln

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

<210> 43
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-450

<400> 43

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

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

<210> 44
<211> 508
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-508

<400> 44

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

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

<210> 45
<211> 506
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-506

<400> 45

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

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

<210> 46
<211> 504
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-504

<400> 46
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser
500

<210> 47
<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-502

<400> 47
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255

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

<210> 48
<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-500

```
<400> 48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
```

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

<210> 49
<211> 498
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-498

<400> 49

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

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

<210> 50
<211> 496
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-496

<400> 50

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

305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495

<210> 51
<211> 494
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-494

<400> 51
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190

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

<210> 52
<211> 492
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-492

<400> 52

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

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

<210> 53
<211> 488
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-488

<400> 53

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

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

<210> 54
<211> 486
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 tiền chất 1-486

<400> 54
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr

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

<210> 55
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-507

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

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

<210> 56
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-505

```
<400> 56
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
```

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

<210> 57
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-503

<400> 57
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340 345 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
355 360 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
370 375 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385 390 395 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
405 410 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
420 425 430

Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
435 440 445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val Ser Ile Leu
450 455 460
Phe Leu Ile Ile
465

<210> 58
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-501

<400> 58
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu

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

<210> 59
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-499

<400> 59

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

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

<210> 60
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-497

<400> 60

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

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

<210> 61
<211> 460
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-495

<400> 61

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

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

<210> 62
<211> 458
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-493

<400> 62

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

```
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met
    450                 455
```

<210> 63
<211> 456
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-491

<400> 63

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

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

<210> 64
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-489

<400> 64

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

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

<210> 65
<211> 455
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-490

<400> 65

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

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

<210> 66
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-487

```
<400> 66
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
```

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

<210> 67
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-485

<400> 67

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

Ala Ser
450

<210> 68
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-484

<400> 68
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340 345 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp

```
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala
```

<210> 69
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-483

<400> 69

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

```
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
```

<210> 70
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-482

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

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

<210> 71
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-481

<400> 71

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

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

<210> 72
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-480

<400> 72

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

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

<210> 73
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-479

<400> 73

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

```
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
465                 470                 475
```

<210> 74
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-478

<400> 74

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

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

<210> 75
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-477

<400> 75

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

```
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
        435                 440
```

<210> 76
<211> 441
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-476

<400> 76

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

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

<210> 77
<211> 440
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-475

<400> 77

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

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

<210> 78
<211> 439
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-474

<400> 78

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

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

<210> 79
<211> 438
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-473

<400> 79

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

<210> 80
<211> 437
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-472

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

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

<210> 81
<211> 436
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-471

<400> 81

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

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

<210> 82
<211> 435
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-470

<400> 82

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

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

<210> 83
<211> 434
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-469

<400> 83
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160

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

<210> 84
<211> 433
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-468

<400> 84
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile

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

<210> 85
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-467

<400> 85

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 86
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-466

<400> 86

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

420 425 430

<210> 87
<211> 430
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-465

<400> 87

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

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


<210> 88
<211> 429
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-464

<400> 88
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
        195                 200                 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225                 230                 235                 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
                245                 250                 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
            260                 265                 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
```

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

<210> 89
<211> 427
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-462

<400> 89
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255

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

<210> 90
<211> 425
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-460

<400> 90

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

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

<210> 91
<211> 423
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-458

<400> 91

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

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

<210> 92
<211> 421
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-456

```
<400> 92
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
```

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

<210> 93
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-454

<400> 93

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
```

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

<210> 94
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> HuPH20 trưởng thành 36-452

<400> 94

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

<210> 95
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-450

<400> 95

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

Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385 390 395 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys
405 410 415

<210> 96
<211> 473
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-508

<400> 96
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys

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

<210> 97
<211> 471
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-506

<400> 97

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

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

<210> 98
<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-504

<400> 98

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

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

<210> 99
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-502

<400> 99

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
```

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

<210> 100
<211> 465
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-500

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

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

<210> 101
<211> 463
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-498

<400> 101
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285

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

<210> 102
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-496

<400> 102

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

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

<210> 103
<211> 459
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-494

<400> 103

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

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

<210> 104
<211> 457
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> esHuPH20 36-492

<400> 104

```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
```

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

<210> 105

<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-488

<400> 105

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

```
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr Asn
        435                 440                 445
Ala Ser Pro Ser Thr
    450
```

<210> 106
<211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HuPH20 trưởng thành 36-486

<400> 106

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

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

<210> 107
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 người 1-509

<400> 107

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

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

<210> 108
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PH20 trưởng thành của người 36-509

```
<400> 108
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
```

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

<210> 109
<211> 482
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 tiền chất 1-482

<400> 109

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

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr

<210> 110
<211> 1446
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ADN mã hóa rHuPH20 tiền chất tan được

<400> 110
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc actttgtggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctac 1446

<210> 111
<211> 553
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> PH20 bò

<400> 111
Met Arg Met Leu Arg Arg His His Ile Ser Phe Arg Ser Phe Ala Gly
1 5 10 15
Ser Ser Gly Thr Pro Gln Ala Val Phe Thr Phe Leu Leu Leu Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Ala Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser
35 40 45

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

```
Cys Leu Lys Val Arg Cys Ser Glu Val Ile Pro Asn Val Thr Gln Lys
        515                 520                 525
Ala Cys Gln Ser Val Lys Leu Lys Asn Ile Ser Tyr Gln Ser Pro Ile
    530                 535                 540
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr Tyr
545                 550
```

<210> 112
<211> 545
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> PH20 thỏ

<400> 112

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

```
                325                 330                 335
Ala Ser Gly Ile Val Val Trp Gly Ser Gln Ser Leu Ala Arg Ser Met
            340                 345                 350
Lys Ser Cys Leu His Leu Asp Asn Tyr Met Lys Thr Ile Leu Asn Pro
        355                 360                 365
Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Asn Gln Val Leu
    370                 375                 380
Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys Thr Arg Lys Asn Trp Asn Pro Asn Asp
385                 390                 395                 400
Tyr Leu His Leu Asn Pro Gly Asn Phe Ala Ile Gln Leu Gly Ser Asn
                405                 410                 415
Gly Thr Tyr Lys Val Asp Gly Lys Pro Thr Leu Thr Asp Leu Glu Gln
            420                 425                 430
Phe Ser Lys Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys
        435                 440                 445
Glu Arg Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val
    450                 455                 460
Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr
465                 470                 475                 480
Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr
                485                 490                 495
Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His
            500                 505                 510
Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn
        515                 520                 525
Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu
    530                 535                 540
Lys
545
```

<210> 113
<211> 114
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 cừu (một phần)

<400> 113

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

<210> 114
<211> 510
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<220>
<223> PH20 khi cynomolgus

<400> 114
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Val Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys
115 120 125
Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg
195 200 205
Ser Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Val Val
260 265 270
Val Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala
290 295 300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu
305 310 315 320
Leu Val Ser Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Ser Leu Ser Ile Thr Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Thr Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

```
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val His Gly Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
465                 470                 475                 480
Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
                485                 490                 495
Val Asn Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
            500                 505                 510
```

<210> 115
<211> 529
<212> PRT
<213> Cavia porcellus

<220>
<223> PH20 chuột lang

<400> 115

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

Ala Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln
260 265 270
Asn Gly Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Leu Met Asp Asp Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr Ile
290 295 300
Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp
305 310 315 320
Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
325 330 335
Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
340 345 350
Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
370 375 380
Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
385 390 395 400
Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
405 410 415
Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
420 425 430
Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
435 440 445
Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
465 470 475 480
Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
485 490 495
Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
500 505 510
Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
515 520 525
Leu

<210> 116
<211> 512
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> PH20 chuột cống

<400> 116
Met Gly Glu Leu Gln Phe Lys Trp Leu Phe Trp Arg Ser Phe Ala Glu
1 5 10 15
Ser Gly Gly Thr Phe Gln Thr Val Leu Ile Phe Leu Phe Ile Pro Tyr
20 25 30
Ser Leu Thr Val Asp Tyr Arg Ala Thr Pro Val Leu Ser Asp Thr Thr
35 40 45
Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val
50 55 60
Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu

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

<210> 117
<211> 512
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<223> PH20 chuột nhắt

<400> 117

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

```
Val Leu Gly Asn Pro Arg Val Gly Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
            420                 425                 430
Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Arg Met Thr Cys Lys Glu Thr Ser Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asn Val Gln Asp Val Asn Val Cys Val Gly Asp Asn Val Cys
    450                 455                 460
Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
465                 470                 475                 480
Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
                485                 490                 495
Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
            500                 505                 510


<210> 118
<211> 520
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 cừu

<400> 118
Leu Asp Phe Pro Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ala Glu Arg Cys Val Lys Ile Phe Lys Leu Pro
            20                  25                  30
Pro Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro Gln Lys Ser Ala
        35                  40                  45
Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
    50                  55                  60
Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Asn Thr Val Tyr Gly Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80
Gln Leu Gly Asn Leu Lys Asn His Leu Glu Lys Ala Lys Lys Asp Ile
                85                  90                  95
Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp
            100                 105                 110
Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
        115                 120                 125
Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys Asn Pro Gln Leu
    130                 135                 140
Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp Phe Glu Thr Ala
145                 150                 155                 160
Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
                165                 170                 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
            180                 185                 190
Asn Tyr Asn Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Ser Asp Leu Glu Lys
        195                 200                 205
Arg Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr Ala Leu
    210                 215                 220
Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Lys Leu Lys Ser Thr Pro Lys Ala
225                 230                 235                 240
Ala Phe Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys
                245                 250                 255
Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr His Arg Pro
            260                 265                 270
Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln Gly Asp Leu Val
```

```
        275                 280                 285
Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met
    290                 295                 300
Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu
305                 310                 315                 320
Gly Asn Tyr Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His Asp Glu Gly Val Cys
            340                 345                 350
Thr Arg Lys Gln Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Ile
        355                 360                 365
Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Lys Gly Gly Lys Tyr Thr Val Pro
    370                 375                 380
Gly Lys Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Thr Phe Ser Asp Lys Phe Tyr
385                 390                 395                 400
Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile Asn Cys Lys Lys Arg Val Asp Ile Lys
                405                 410                 415
Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp Ile Cys Ile Glu
            420                 425                 430
Gly Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser Ser Gln Asn Glu
        435                 440                 445
Ala Ser Thr Thr Thr Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Thr Thr Ala Thr
    450                 455                 460
Thr Val Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys Gln Ser Pro Glu Cys Leu
465                 470                 475                 480
Lys Val Arg Cys Leu Glu Ala Ile Ala Asn Val Thr Gln Thr Gly Cys
                485                 490                 495
Gln Gly Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Gln Ser Ser Ile
            500                 505                 510
Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr
        515                 520
```

<210> 119
<211> 474
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> PH20 bò

<400> 119

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

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

<210> 120
<211> 517
<212> PRT
<213> Ovis aries

<220>
<223> PH20 cừu (Halozym)

```
<400> 120
Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser Phe Leu Trp Ala
 1               5                  10                  15
Trp Asn Ala Pro Ala Glu Arg Cys Ile Lys Ile Phe Lys Leu Pro Pro
```

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

```
                485                 490                 495
Val Lys Trp Lys Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ile Gln Asn Ile Lys
            500                 505                 510
Asn Gln Thr Thr Tyr
        515
```

<210> 121
<211> 1620
<212> ADN
<213> Ovis aries

<220>
<223> ADN mã hóa PH20 cừu ở SEQ ID NO:118

<400> 121
ttttccgtgt tggttggctc tggacttcag agcacccccc ctcatttcaa acacttcttt 60
cctctgggcc tggaatgccc cagctgaacg ttgtattaaa atctttaaac tacctccaga 120
tctgagactc ttctctgtaa aaggaagccc ccaaaaaagt gctacgggac aatttattac 180
attattttat gctgatagac ttggctacta tcctcatata gatgaaaaaa caggcaacac 240
tgtatatgga ggaattcccc agttgggaaa cttaaaaaat catttggaaa aagccaaaaa 300
agacattgcc tattacatac caaatgacag cgtgggcttg gcggtcattg actgggaaaa 360
ctggaggcct acctgggcaa gaaactggaa acctaaagat gtttacaggg atgagtctgt 420
tgagttggtt ctgcaaaaaa atccacaact cagtttccca gaggcttcca agattgcaaa 480
agtggatttt gagacagcag gaaagagttt catgcaagag actttaaaac tgggaaaatt 540
acttcggcca aatcacttat ggggttatta tctttttcct gattgttaca atcataatta 600
taaccagcct acttacaatg gaaattgctc tgatttagaa aaaaggagaa atgatgatct 660
cgactggttg tggaaggaaa gcactgccct tttcccttct gtttatttga atatcaagtt 720
aaaatctact ccaaaagctg ccttctatgt tcgtaatcgt gtccaggaag ccattcggtt 780
gtctaaaata gcgagtgttg aaagtccact tcccgttttt gtatatcacc gtccagtttt 840
tactgatggg tcttcaacat acctttctca gggtgacctt gtgaattcgg ttggtgagat 900
cgttgctcta ggtgcctctg ggattataat gtggggcagt ctcaatctaa gcctaactat 960
gcaatcttgc atgaacctag gcaattactt gaacactaca ctgaatcctt acataatcaa 1020
cgtcacccta gcagccaaaa tgtgcagcca agtgctttgc cacgatgaag gagtgtgtac 1080
aaggaaacaa tggaattcaa gcgactatct tcacctgaac ccaatgaatt ttgctattca 1140
aactgggaaa ggtggaaaat acacagtacc tgggaaagtc acacttgaag acctgcaaac 1200
gttttctgat aaatttttatt gcagttgtta tgccaacatc aactgtaaga agagagttga 1260
tataaaaaat gttcatagtg ttaatgtatg tatggcagaa gacatttgta tagagggccc 1320
tgtgaagtta caacccagtg atcattcctc tagccagaat gaggcatcta ctaccaccgt 1380
cagcagtatc tcaccctcta ctacagccac cacagtatct ccatgtactc ctgagaaaca 1440
gtcccctgag tgcctcaaag tcaggtgttt ggaagccatc gccaacgtca cccaaacggg 1500
gtgtcaaggt gttaaatgga agaacacttc cagtcagtca agtattcaaa atattaaaaa 1560
tcaaacaacc tattaaaata taaattcagt gcttataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620

<210> 122
<211> 447
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 tan được 36-482

<400> 122
```
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1               5                  10                  15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
            20                  25                  30
```

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

<210> 123
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 tan được 36-481

<400> 123
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340 345 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
355 360 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
370 375 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385 390 395 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
405 410 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala

420 425 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
435 440 445

<210> 124
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 tan được 36-480

<400> 124
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175
Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
180 185 190
His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
195 200 205
Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
210 215 220
Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
225 230 235 240
Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
245 250 255
Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
260 265 270
Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
275 280 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
290 295 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305 310 315 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
325 330 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
340 345 350

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


<210> 125
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPh20 tan được 36-479

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

```
        275                 280                 285
Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
    290                 295                 300
Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
                325                 330                 335
Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
            340                 345                 350
Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu Asn Pro Asp
        355                 360                 365
Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr Val Arg Gly
    370                 375                 380
Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys Phe Tyr Cys
385                 390                 395                 400
Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp Val Lys Asp
                405                 410                 415
Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
        435                 440
```

<210> 126
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPH20 tan được 36-478

<400> 126

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

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

<210> 127
<211> 442
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> rHuPh20 tan được 36-477

<400> 127

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

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

<210> 128
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-467

<400> 128

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

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

<210> 129
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-477

<400> 129
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys

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


<210> 130
<211> 478
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-478

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

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

<210> 131
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-479

<400> 131
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys

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

<210> 132
<211> 480
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-480

<400> 132

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

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

<210> 133
<211> 481
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-481

<400> 133
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys

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

465 470 475 480
Phe

<210> 134
<211> 483
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 tiền chất 1-483

<400> 134
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350

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

<210> 135
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 trưởng thành 36-467

<400> 135

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

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

<210> 136
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> sHuPH20 trưởng thành 36-483

<400> 136
Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
1 5 10 15
Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
35 40 45
Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
50 55 60
Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
65 70 75 80
Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
85 90 95
Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
100 105 110
Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
115 120 125
Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
130 135 140
Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
145 150 155 160
Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
165 170 175

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

<210> 137
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> biến thể PH20 tiền chất P48A

<400> 137

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

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

<210> 138
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> biến thể PH20 tiền chất L499W

<400> 138

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

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

<210> 139
<211> 1449
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Trình tự mARN Gen2

<400> 139
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaatttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag tcaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactga 1449

<210> 140
<211> 6630
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vecto HZ24

<400> 140
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca 1080
catcttttte agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct 1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc 1200
tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaaggtgt 1320
tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttccttacaa gaccatctgg acaaagctaa 1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggtc 1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca 1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt 1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac 2040
tgttgctctg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat 2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa 2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acctggagca 2340
attttctgaa aaatttttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga 2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa 2520
cgccctctc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg 2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 2640
cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc 2820
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataagctt gccacaaccc acagcggccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaatctggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600

aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcaggggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcacttttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggcctttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

<210> 141
<211> 186
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<223> dihydrofolat reductaza

<400> 141
Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile
1 5 10 15
Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe Lys
20 25 30
Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn
35 40 45
Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys Asn
50 55 60
Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
65 70 75 80
Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ala
85 90 95
Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met Val
100 105 110
Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln Pro
115 120 125
Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu Ser
130 135 140
Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu Pro
145 150 155 160
Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile Lys
165 170 175
Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
180 185

<210> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thẻ sáu His

<400> 142
His His His His His His
1 5

<210> 143
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thẻ Flag

<400> 143
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 144
<211> 22
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit tín hiệu IgK người

<400> 144
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1   5   10   15
Leu Pro Gly Ala Arg Gly
            20

<210> 145
<211> 21
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Peptit tín hiệu IgK chuột nhắt

<400> 145
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1   5   10   15
Gly Ser Thr Gly Asp
            20

<210> 146
<211> 1500
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-SSVA với các vị trí giới hạn
      NheI và BamHI

<400> 146
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260

aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gcgtggcatg ataaggatcc 1500

<210> 147
<211> 1494
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-IISS với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 147
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gctgataagg atcc 1494

<210> 148
<211> 1488
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-FLII với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 148
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360

acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatgat aaggatcc 1488

<210> 149
<211> 1482
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-ILFL với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 149
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg tgataaggat cc 1482

<210> 150
<211> 1476

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-VSIL với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 150
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat actttgataa ggatcc 1476

<210> 151
<211> 1470
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-FIVS với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 151
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840

cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatcttg ataaggatcc 1470

<210> 152
<211> 1464
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-TMFI với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 152
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tctgataagg atcc 1464

<210> 153
<211> 1458
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-SATM với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 153

gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggat gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgtgat aaggatcc 1458

<210> 154
<211> 1452
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-TLSA với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 154
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggat gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320

actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
tgataaggat cc 1452

<210> 155
<211> 1446
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-PSTL với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 155
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgtgataa 1440
ggatcc 1446

<210> 156
<211> 1440
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-ASPS với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 156
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480

gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctcctg ataaggatcc 1440

<210> 157
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-YNAS với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 157
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct cctgataagg atcc 1434

<210> 158
<211> 1431
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-FYNA với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 158
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct gataaggatc c 1431

<210> 159
<211> 1428
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-IFYN với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 159
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080

gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaactgat aaggatcc 1428

<210> 160
<211> 1425
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-QIFY với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 160
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tactgataag gatcc 1425

<210> 161
<211> 1422
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-PQIF với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 161
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360

acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tgataaggat cc 1422

<210> 162
<211> 1419
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-EPQI với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 162
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatctga taaggatcc 1419

<210> 163
<211> 1416
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-EEPQ với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 163
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagtgataa ggatcc 1416

<210> 164
<211> 1413
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-TEEP với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 164
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020

ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ctgataagga tcc 1413

<210> 165
<211> 1410
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-ETEE với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 165
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagtg ataaggatcc 1410

<210> 166
<211> 1407
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-METE với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 166
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300

ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgagtgata aggatcc 1407

<210> 167
<211> 1404
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-PMET với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 167
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga cttgataagg atcc 1404

<210> 168
<211> 1401
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-PPME với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 168
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggagt gataaggatc c 1401

<210> 169
<211> 1398
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-KPPM với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 169
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960

ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatgtgat aaggatcc 1398

<210> 170
<211> 1395
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-LKPP với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 170
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccatgataag gatcc 1395

<210> 171
<211> 1392
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-FLKP với các vị trí giới hạn
NheI và BamHI

<400> 171
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240

tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
tgataaggat cc 1392

<210> 172
<211> 1389
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-AFLK với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 172
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagtga 1380
taaggatcc 1389

<210> 173
<211> 1386

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-DAFL với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 173
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctctgataa 1380
ggatcc 1386

<210> 174
<211> 1383
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-IDAF với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 174
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900

gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt ttgataagga 1380
tcc 1383

<210> 175
<211> 1380
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-CIDA với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 175
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctg ataaggatcc 1380

<210> 176
<211> 1377
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-VCID với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 176
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180

ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgactgata aggatcc 1377

<210> 177
<211> 1374
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-GVCI với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 177
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta tttgataagg atcc 1374

<210> 178
<211> 1371
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-DGVC với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 178
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgtt gataaggatc c 1371

<210> 179
<211> 1365
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-IADG với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 179
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020

ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat gggtgataag gatcc 1365

<210> 180
<211> 1359
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-VCIA với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 180
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgcctga taaggatcc 1359

<210> 181
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-VDVC với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 181
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420

cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg ctgataagga tcc 1353

<210> 182
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-DAVD với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 182
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgactgata aggatcc 1347

<210> 183
<211> 1341
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-DTDA với các vị trí giới hạn

NheI và BamHI

<400> 183
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgcct gataaggatc c 1341

<210> 184
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-VKDT với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 184
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctcccct cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260

aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
acttgataag gatcc 1335

<210> 185
<211> 1329
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-ADVK với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 185
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaatga 1320
taaggatcc 1329

<210> 186
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit tín hiệu PH20

<400> 186
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20   25   30
Cys Leu Thr
        35

<210> 187
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis

<400> 187

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

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

<210> 188
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis-N368A (mut1)

<400> 188

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

```
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Ala
        355                 360                 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
                485                 490                 495
```

<210> 189
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis-N393A (mut2)

<400> 189

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

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

<210> 190
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis-N368A/N393A (mut3)

<400> 190

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

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

<210> 191
<211> 17

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-447

<400> 191
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
1 5 10 15
Tyr

<210> 192
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-446

<400> 192
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe
1 5 10 15

<210> 193
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-445

<400> 193
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
1 5 10 15

<210> 194
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-444

<400> 194
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln
1 5 10

<210> 195
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-443

<400> 195
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
1 5 10

<210> 196
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit đầu cùng C được tách từ rHuPH20 aa 431-442

<400> 196
Asp Ala Phe Lys Leu Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu
1 5 10

<210> 197
<211> 510
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<220>
<223> PH20 tinh tinh

<400> 197
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Val Thr Gly Gln Asp Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn

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

<210> 198
<211> 512
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<220>
<223> PH20 khi Rhesus

<400> 198
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ile Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95

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

<210> 199
<211> 1485
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-LFLI với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 199
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg atttgataag gatcc 1485

<210> 200
<211> 1479
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-SILF với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 200
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960

ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttctga taaggatcc 1479

<210> 201
<211> 1473
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN được tối ưu hóa codon SPAM1-IVSI với các vị trí giới hạn NheI và BamHI

<400> 201
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat atgataagga tcc 1473

<210> 202
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N82A

<400> 202
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1   5   10   15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys

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

485 490 495

<210> 203
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N166A

<400> 203

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

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

<210> 204
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N235A

<400> 204

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

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

<210> 205
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N254A

<400> 205

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

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

<210> 206
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N82A/N166A

<400> 206
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys

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

465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser His His His His His His
485 490 495

<210> 207
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N82A/N254A

<400> 207
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Ala Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Ala Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350

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

<210> 208
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N166A/N254A

<400> 208

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

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

<210> 209
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis N82A/N166A/N254A

<400> 209
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Ala Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110

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

<210> 210
<211> 1494
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PH20sHis ADN

<400> 210
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactcttaa cttcagagct 120
ccccctgtaa tcccaaacgt ccccttcctg tgggcatgga acgcccctag cgaattctgt 180
ttggggaaat ttgacgaacc tctggacatg tctctgtttt cttttatcgg tagccctcga 240
atcaacgcta ccggacaggg ggtgacaatc ttttacgtgg atcgtctggg ctattaccct 300
tacatcgaca gcattactgg ggtgaccgtg aacggaggca ttcctcagaa aatatcactg 360
caggaccacc tggacaaagc taagaaggat attacattct acatgccagt ggacaatctc 420
ggaatggctg tgattgactg ggaggagtgg agacctactt gggcccgaaa ttggaagccc 480
aaggatgtgt ataagaaccg atccattgag ctggtgcagc agcagaacgt gcagctgtcc 540
cttacagaag ccaccgaaaa agctaagcag gaattcgaga aagctgggaa ggatttcctg 600
gttgagacaa taaaacttgg gaaactgctt agacctaacc acctctgggg ctattatttg 660
ttccccgatt gctacaatca ccactataag aagcccggct acaacggatc ttgtttcaac 720
gtcgaaatta aaagaaacga tgacctctct tggttgtgga atgagtctac tgcactctac 780
ccctctatat atctcaacac acagcagtcc ccagtagccg ctaccctcta cgttcggaat 840
agagtgaggg aagccatcag ggtgtccaag atccccgatg ccaaatctcc cctcccagtg 900
tttgcctaca ccaggatcgt gtttaccgac caggtgttga agttcctgag ccaggacgag 960
ctcgtgtata cttttggcga gacagttgct ctgggagcct ctgggatcgt gatctggggc 1020
actctgagta ttatgcgatc aatgaagtcc tgcctgctgt tggataacta catggagaca 1080
atcctgaacc catatatcat taacgtgact ttggccgcta agatgtgttc acaggtgctg 1140
tgtcaagagc agggagtatg cattaggaag aactggaact caagcgatta tctccatctg 1200
aacccagata attttgcaat ccagctggaa aagggtggta aattcactgt ccgagggaag 1260
cccacactcg aggatctcga acagtttagt gaaaagttct actgtagctg ctatagcact 1320
ctgagttgta aggaaaaagc cgatgtgaaa gacactgatg ccgttgacgt ttgcatcgcc 1380
gatggggtgt gtattgacgc ctttctcaag ccaccaatgg agactgagga gccccagatc 1440
ttttacaacg cctccccctc caccttgagt catcatcatc atcatcatta gtaa 1494

<210> 211
<211> 1497
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SPAM1-ISSV

<400> 211
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggtg gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320

actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcaa gcgtgtgata aggatcc 1497

<210> 212
<211> 1491
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SPAM1-LIIS

<400> 212
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatctat acttttcctg attatatcat gataaggatc c 1491

<210> 213
<211> 1467
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SPAM1-MFIV

<400> 213
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600

cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttca tcgtatgata aggatcc 1467

<210> 214
<211> 1461
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SPAM1-ATMF

<400> 214
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacaggggct gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
accatgttct gataaggatc c 1461

<210> 215
<211> 1455
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SPAM1-LSAT

<400> 215
gctagcatgg acatgagggt accagcccag ctgttgggcc ttcttctgct ttggctccct 60
ggggcaaggg gacttaactt cagagctccc cctgtaatcc caaacgtccc cttcctgtgg 120
gcatggaacg cccctagcga attctgtttg gggaaatttg acgaacctct ggacatgtct 180
ctgttttctt ttatcggtag ccctcgaatc aacgctaccg gacagggggt gacaatcttt 240
tacgtggatc gtctgggcta ttacccttac atcgacagca ttactggggt gaccgtgaac 300
ggaggcattc ctcagaaaat atcactgcag gaccacctgg acaaagctaa gaaggatatt 360
acattctaca tgccagtgga caatctcgga atggctgtga ttgactggga ggagtggaga 420
cctacttggg cccgaaattg gaagcccaag gatgtgtata agaaccgatc cattgagctg 480
gtgcagcagc agaacgtgca gctgtccctt acagaagcca ccgaaaaagc taagcaggaa 540
ttcgagaaag ctgggaagga tttcctggtt gagacaataa aacttgggaa actgcttaga 600
cctaaccacc tctggggcta ttatttgttc cccgattgct acaatcacca ctataagaag 660
cccggctaca acggatcttg tttcaacgtc gaaattaaaa gaaacgatga cctctcttgg 720
ttgtggaatg agtctactgc actctacccc tctatatatc tcaacacaca gcagtcccca 780
gtagccgcta ccctctacgt tcggaataga gtgagggaag ccatcagggt gtccaagatc 840
cccgatgcca aatctccccc cccagtgttt gcctacacca ggatcgtgtt taccgaccag 900
gtgttgaagt tcctgagcca ggacgagctc gtgtatactt ttggcgagac agttgctctg 960
ggagcctctg ggatcgtgat ctggggcact ctgagtatta tgcgatcaat gaagtcctgc 1020
ctgctgttgg ataactacat ggagacaatc ctgaacccat atatcattaa cgtgactttg 1080
gccgctaaga tgtgttcaca ggtgctgtgt caagagcagg gagtatgcat taggaagaac 1140
tggaactcaa gcgattatct ccatctgaac ccagataatt ttgcaatcca gctggaaaag 1200
ggtggtaaat tcactgtccg agggaagccc acactcgagg atctcgaaca gtttagtgaa 1260
aagttctact gtagctgcta tagcactctg agttgtaagg aaaaagccga tgtgaaagac 1320
actgatgccg ttgacgtttg catcgccgat ggggtgtgta ttgacgcctt tctcaagcca 1380
ccaatggaga ctgaggagcc ccagatcttt tacaacgcct ccccctccac cttgagtgct 1440
acctgataag gatcc 1455