

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **030252**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.1

(48) Дата публикации исправления
2021.09.08, Бюллетень №9'2021

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.07.31

(21) Номер заявки
201400772

(22) Дата подачи заявки
2012.12.28

(51) Int. Cl. **A61K 38/47** (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

**(54) ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ PH20, КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ И ИХ
ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 61/631,313; 61/796,208

(32) 2011.12.30; 2012.11.01

(33) US

(43) 2015.07.30

(86) PCT/US2012/072182

(87) WO 2013/102144 2013.07.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГАЛОЗИМ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Вей Ги, Шепард Х. Майкл, Цхао
Кипинг, Коннор Роберт Джеймс (US)**

(74) Представитель:
Стояченко И.Л. (RU)

(56) WO-A2-2009128917
SEATON G.J. ET AL.: "Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity", BIOLOGY OF REPRODUCTION, NEW YORK, NY [U.A.]: ACADEM. PRESS, US, vol. 62, no. 6, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 1667-1676, XP003006238, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/BIOLREPROD62.6.1667 the whole document

JIANG PING ET AL.: "Effects of recombinant human PH20 (rHuPH20) on interstitial matrices: creating a favorable environment for the delivery of cytostatic agents", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER

RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 46, 1 April 2005 (2005-04-01), page 1198, XP001525054, ISSN: 0197-016X

MAKSIMENKO A.V. ET AL.: "Resistance of Dextran-Modified Hyaluronidase to Inhibition by Heparin", BIOCHEMISTRY (MOSCOW), KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 66, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 456-463, XP019294336, ISSN: 1608-3040 the whole document
US-A1-2010143457

CAROLE E. SCHANTE ET AL.: "Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino-acids", CARBOHYDRATE POLYMERS, 1 October 2011 (2011-10-01), XP055058200, ISSN: 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.050 the whole document
WO-A1-2012136768

ARMING SIGRID ET AL.: "In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm", 19970801, vol. 247, no. 3, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 810-814, XP002661048, abstract

REITINGER S. ET AL.: "Designed Human Serum Hyaluronidase 1 Variant, HYAL1 L, Exhibits Activity up to pH 5.9", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 29, 17 July 2009 (2009-07-17), pages 19173-19177, XP55058375, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.C109.004358 the whole document

CSOKA A.B. ET AL.: "The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes", MATRIX BIOLOGY, ELSEVIER, NL, vol. 20, no. 8, 1 December 2001 (2001-12-01), pages 499-508, XP002507271, ISSN: 0945-053X, DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00172-X the whole document

(57) Предусмотрены модифицированные полипептиды гиалуронидазы PH20, включая модифицированные полипептиды, которые проявляют увеличенную стабильность и/или увеличенную активность. Также в настоящем документе предусмотрены композиции и лекарственные формы и их применение.

Родственные заявки

Заявка претендует на приоритет предварительной заявки США № 61/631313, поданной 30 декабря 2011 г., и предварительной заявки США № 61/796208, поданной 1 ноября 2012 г., каждая из которых озаглавлена "Варианты полипептида RH20, лекарственные формы и их применение".

Эта заявка родственна заявке США № 13/684731, поданной в тот же день с этой заявкой, озаглавленной "Варианты полипептидов RH20, композиции на их основе и их применение", которая претендует на приоритет предварительной заявки США № 61/631313 и предварительной заявки США № 61/796208.

В допустимых случаях предмет каждой из вышеуказанных родственных заявок включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Включение посредством ссылки перечня последовательностей, представленного в электронном виде

Электронная версия перечня последовательностей подана с этой заявкой, и его содержание включено посредством ссылки во всей своей полноте. Электронный файл создан 28 декабря 2012 г., имеет размер 3,48 мегабайт и называется 3087seqPCI.txt.

Область техники

Предусмотрены модифицированные полипептиды гиалуронидазы RH20, в том числе модифицированные полипептиды, которые имеют повышенную (увеличенную) стабильность и/или повышенную (увеличенную) активность. Также предусмотрены композиции и лекарственные формы, и их применение.

Предшествующий уровень техники

Гиалуронан (гиалуроновая кислота; HA) представляет собой полипептид, который находится во внеклеточном матриксе многих клеток, в особенности мягких соединительных тканей. HA у млекопитающих также находится преимущественно в коже, хряще и в синовиальной жидкости. Гиалуронан также является главной составляющей стекловидного тела глаза. HA играет важную роль в различных физиологических процессах, таких как водный и белковый гомеостаз плазмы (Laurent T.C. et al. (1992) FASEB J. 6: 2397-2404). Некоторые заболевания ассоциированы с экспрессией и/или продукцией гиалуронана. Деградирующие гиалуронан ферменты, такие как гиалуронидазы, представляют собой ферменты, которые деградируют (разрушают) гиалуронан. Ввиду того, что деградирующие гиалуронан ферменты (например, гиалуронидазы) катализируют деградацию (разрушение) HA, они могут использоваться для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с накоплением HA или других гликозаминогликанов. Также поскольку HA является главным компонентом интерстициального барьера, деградирующие гиалуронан ферменты (например, гиалуронидазы) увеличивают проницаемость тканей и поэтому могут использоваться для увеличения диффузии и улучшения доставки терапевтических агентов. Различные гиалуронидазы имеют терапевтическое применение (например, Hydase™, Vitrase™ и Wydase™), обычно в качестве диспергирующих или усиливающих распространение агентов в комбинации с другими терапевтическими агентами. Многие гиалуронидазы являются овечьими или бычьими формами и при лечении могут оказаться иммуногенными для человека. Существует необходимость в улучшенных деградирующих гиалуронан ферментах, таких как гиалуронидазы, и композициях на их основе, которые можно было бы использовать для лечения.

Сущность изобретения

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, которые имеют измененное свойство или измененные свойства по сравнению с полипептидом RH20, который не имеет модификацию (модификации). Модификации включают замены, делеции и/или вставки аминокислот. В настоящем документе детально раскрыта зависимость структура/функция для фактически каждой аминокислоты в полипептиде RH20, а также идентифицированы остатки и локусы, которые вносят вклад в изменение свойств, таких как стабильность в определенных условиях. Таким образом, в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, которые содержат одну или более замен аминокислот, которые приводят к полипептиду RH20, который сохраняет активность и/или проявляет увеличенную или измененную стабильность в различных условиях. Сохраненная активность может представлять собой, например, гиалуронидазную активность, которая составляет по меньшей мере примерно 40% или более от активности полипептида RH20, который не включает замены. Примеры модификаций представляют собой замены аминокислот. В настоящем документе замены аминокислот обозначают с помощью однобуквенного обозначения аминокислоты, за которым указывают положение аминокислоты в SEQ ID NO: 3, в котором происходит замена. Однобуквенные аббревиатуры для обозначения аминокислотных остатков хорошо известны специалистам в данной области (см., например, табл. 1) и используются в настоящем документе в описании и примерах. Например, замена на P в позиции, соответствующей позиции 204 в полипептиде RH20, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, означает, что замены включают замену F204P в полипептиде RH20, приведенном в SEQ ID NO: 3, или такую же замену в соответствующей позиции в другом полипептиде RH20.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в полипептиде RH20, где модифицированные полипептиды RH20 проявляют увеличенную стабильность по сравнению с полипептидом RH20, не содержащим

аминокислотные замены. Увеличенная стабильность может проявляться в виде увеличенной устойчивости к одному или более условиям для белка, которые представляют собой денатурирующие белок условия. Стабильность модифицированного и не модифицированного PH20 сравнивают при одинаковых условиях. Примеры денатурирующих белок условий (или условий для денатурации, термины используют взаимозаменяемо в настоящем документе) включают, но не ограничиваются ими, повышенную температуру более чем 30°C или примерно 30°C, перемешивание, низкое содержание солей, включая, по существу, отсутствие солей, или практически отсутствие солей, или отсутствие солей, и присутствие эксципиентов, которые ведут к денатурации белков. Примеры таких эксципиентов представляют собой антиадгезионный агент (агенты), связующий агент (агенты), агент (агенты) для покрытия оболочкой, наполнитель (наполнители) и разбавитель (разбавители), вкусоароматический агент (агенты), краситель (красители), смазывающее вещество (смазывающие вещества), глидант (глиданты), консервант (консерванты), детергент (детергенты), сорбент (сорбенты) и их комбинации.

Модифицированный полипептид PH20 может представлять собой полипептид, у которого не модифицированная форма обладает по меньшей мере примерно 68% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и который дополнительно содержит модификации, которые изменяют стабильность, и/или может представлять собой полипептид PH20, который включает примерно до 100, 110, 120, 130, 150 отличий аминокислотной последовательности по сравнению с PH20, но сохраняет энзиматическую активность, в частности по меньшей мере примерно 40% активности не модифицированного полипептида PH20, и проявляет увеличенную стабильность, например стабильность при денатурирующих условиях. Таким образом, предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые имеют по меньшей мере 68% или примерно 68% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3. Предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые имеют по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3. Примеры таких модифицированных полипептидов PH20 представляют собой полипептиды, которые содержат аминокислотную замену (замены) в полипептиде PH20, который содержит последовательность аминокислотных остатков, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870, или последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 или 870.

Например, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, который проявляет увеличенную стабильность, содержащий аминокислотную замену в полипептиде PH20, которая опосредует увеличенную стабильность, где увеличенная стабильность проявляется как увеличенная устойчивость к денатурации в присутствии одного или более денатурирующих белок условий, где стабильность увеличена по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену, и не модифицированный полипептид PH20 состоит из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NOS: 7, и представляет собой ее укороченный с С-конца фрагмент, который представляет собой растворимый полипептид PH20, или обладает по меньшей мере 85% идентичности последовательности по сравнению с ней. Как указано выше, модифицированный полипептид PH20, который проявляет увеличенную стабильность, проявляет увеличенную стабильность к денатурирующему условию, которое представляет собой температуру более чем или примерно 30°C; перемешивание; низкое содержание солей или отсутствие солей; или присутствие эксципиента или денатурирующего агента, такого как антиадгезионный агент (агенты), связующий агент (агенты), агент (агенты) для покрытия оболочкой, наполнитель (наполнители) и разбавитель (разбавители), вкусоароматический агент (агенты), краситель (красители), смазывающее вещество (смазывающие вещества), глидант (глиданты), консервант (консерванты), детергент (детергенты), сорбент (сорбенты) или подсластитель (подсластители) и их комбинации, и в частности консервант. В некоторых примерах таких модифицированных полипептидов PH20, которые проявляют увеличенную стабильность, денатурирующее условие представляет собой температуру более чем 30°C, и модифицированный полипептид PH20 проявляет большую гиалуронидазную активность при указанной температуре по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены), где активности сравнивают при одинаковых условиях. В других примерах денатурирующие белок условия представляют собой присутствие низкой концентрации соли менее чем 100 мМ, и модифицированный полипептид PH20 проявляет увеличенную гиалуронидазную активность в присутствии низкой концентрации соли по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены), где активности сравнивают при одинаковых условиях.

В любом из описанных выше примеров модифицированного полипептида PH20, который проявляет увеличенную стабильность, стабильность может быть оценена на основании различных параметров, включая гиалуронидазную активность, растворимость, агрегацию и/или кристаллизацию. Стабильность может быть оценена в присутствии денатурирующего условия. Когда сравнивают стабильность двух или более полипептидов, стабильность оценивают при одинаковых условиях. В некоторых вариантах полипептидов PH20, предусмотренных в настоящем документе, модифицированный полипептид PH20 прояв-

ляет по меньшей мере 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000% или большую гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом РН20, не содержащим аминокислотную замену (замены).

В любом из описанных выше примеров модифицированного полипептида РН20, который проявляет увеличенную стабильность, денатурирующие условия включают присутствие эксципиентов, которые денатурируют белки. Примеры таких условий представляет собой присутствие консерванта, такого как фенольный консервант. В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды РН20, которые проявляют увеличенную стабильность в присутствии эффективного против микроорганизмов количества одного или более фенольных консервантов. Эффективное против микроорганизмов количество представляет собой общее количество одного или более фенольных консервантов, которое может быть выражено в виде процента (%) концентрации по массе (масса/объем), составляет или составляет между (или составляет по меньшей мере примерно или примерно) 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4% включительно. Примеры фенольных консервантов включают ими, но не ограничиваются ими, фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт и парабен, такой как метилпарабен и пропилпарабен, м-крезол, фенол или м-крезол и фенол. Например, предусмотренные модифицированные полипептиды РН20 проявляют стабильность, характеризующуюся тем, что модифицированные полипептиды РН20 проявляют по меньшей мере 15% или примерно 15% гиалуронидазной активности в присутствии консерванта (консервантов) в течение по меньшей мере 4 ч по сравнению с модифицированным полипептидом РН20 в отсутствие консерванта. Активность сравнивают при одинаковых условиях за исключением присутствия консерванта (консервантов). Например, в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды РН20, которые проявляют по меньшей мере (или по меньшей мере примерно) 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую гиалуронидазную активность в присутствии фенольного консерванта (консервантов) по сравнению с отсутствием указанного консерванта (консервантов). Таким образом, среди модифицированных полипептидов РН20, предусмотренных в настоящем документе, предусмотрены полипептиды РН20, которые вследствие аминокислотной замены (замен) являются устойчивыми к фенольным соединениям по сравнению с полипептидами РН20 без такой замены. Предусмотрены модифицированные полипептиды РН20, которые проявляют гиалуронидазную активность после по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней, 3, 4 недель или более в присутствии консерванта (консервантов) по сравнению с гиалуронидазной активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение такого же периода времени и при одинаковых условиях за исключением присутствия консерванта (консервантов).

В примерах модифицированного полипептида РН20, который проявляет увеличенную стабильность к фенольному консерванту, увеличенная стабильность в фенольном консерванте может проявляться при температуре, которая включает любую температуру между, например, 0 и 40°C, например между или примерно между 0 и 40°C, 2 и 6°C, 24 и 32°C и 35 и 40°C. Примеры полипептидов проявляют увеличенную стабильность при температуре между или примерно между 30 и 45°C, 35 и 45°C, 30 и 37°C, 35 и 37°C или 37 и 42°C включительно. Конкретные модифицированные полипептиды РН20 и условия зависят от предполагаемой лекарственной формы, условий, которым лекарственная форма будет подвергаться, и/или предполагаемого применения.

Конкретные примеры модифицированных полипептидов РН20, которые проявляют увеличенную стабильность, такую как увеличенная стабильность к фенольному консерванту, включают модифицированные полипептиды РН20, которые содержат одну аминокислотную модификацию, такую как замену, и комбинации модификаций, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и более модификаций. Примеры включают модифицированные полипептиды РН20, которые содержат одну или более замен аминокислот, где по меньшей мере одна замена представляет собой замену в аминокислотной позиции, соответствующей (т.е. с помощью выравнивания) позиции, выбранной из 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 или 445 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида РН20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3. Примеры таких модификаций представляют собой по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замен на глицин (G) в позиции, соответствующей позиции 10; K в позиции, соответствующей позиции 12; S в позиции, соответствующей позиции 20; T в позиции, соответствующей позиции 22; M в позиции, соответствующей позиции 26; W в позиции, соответствующей позиции 34; N в позиции, соответствующей позиции 36; L в позиции, соответствующей позиции 46; M в позиции, соответствующей позиции 50; T в позиции, соответствующей позиции 52; S в позиции, соответствующей позиции 52; C в позиции, соответствующей позиции 58; K в позиции, соответствующей позиции 58; R в позиции, соответствующей позиции 58; N в позиции, соответствующей позиции 58; Y в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 58; H в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 68; V в позиции, соот-

ветствующей позиции 70; E в позиции, соответствующей позиции 74; L в позиции, соответствующей позиции 82; N в позиции, соответствующей позиции 82; V в позиции, соответствующей позиции 83; Q в позиции, соответствующей позиции 83; S в позиции, соответствующей позиции 83; G в позиции, соответствующей позиции 83; N в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; K в позиции, соответствующей позиции 86; E в позиции, соответствующей позиции 97; L в позиции, соответствующей позиции 97; R в позиции, соответствующей позиции 127; R в позиции, соответствующей позиции 131; L в позиции, соответствующей позиции 138; K в позиции, соответствующей позиции 142; N в позиции, соответствующей позиции 142; P в позиции, соответствующей позиции 142; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; G в позиции, соответствующей позиции 143; K в позиции, соответствующей позиции 143; T в позиции, соответствующей позиции 144; Q в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 169; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; N в позиции, соответствующей позиции 195; E в позиции, соответствующей позиции 196; R в позиции, соответствующей позиции 196; P в позиции, соответствующей позиции 204; A в позиции, соответствующей позиции 205; E в позиции, соответствующей позиции 205; I в позиции, соответствующей позиции 206; A в позиции, соответствующей позиции 213; I в позиции, соответствующей позиции 219; M в позиции, соответствующей позиции 234; T в позиции, соответствующей позиции 237; H в позиции, соответствующей позиции 238; Q в позиции, соответствующей позиции 240; V в позиции, соответствующей позиции 249; A в позиции, соответствующей позиции 261; K в позиции, соответствующей позиции 261; T в позиции, соответствующей позиции 267; K в позиции, соответствующей позиции 277; H в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 291; E в позиции, соответствующей позиции 309; Q в позиции, соответствующей позиции 310; Y в позиции, соответствующей позиции 314; Y в позиции, соответствующей позиции 315; N в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; D в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции соответствующая позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 375; R в позиции, соответствующей позиции 376; V в позиции, соответствующей позиции 399; E в позиции, соответствующей позиции 401; A в позиции, соответствующей позиции 407; L в позиции, соответствующей позиции 416; K в позиции, соответствующей позиции 419; H в позиции, соответствующей позиции 421; E в позиции, соответствующей позиции 431; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; C в позиции, соответствующей позиции 439; P в позиции, соответствующей позиции 440; G в позиции, соответствующей позиции 443; N в позиции, соответствующей позиции 445, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, модифицированный полипептид PH20 может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены на T в позиции, соответствующей позиции 52, K в позиции, соответствующей позиции 58, R в позиции, соответствующей позиции 58, P в позиции, соответствующей позиции 68, V в позиции, соответствующей позиции 83, P в позиции, соответствующей позиции 204, A в позиции, соответствующей позиции 261, T в позиции, соответствующей позиции 267, K в позиции, соответствующей позиции 277 и H в позиции, соответствующей позиции 421, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Пример модифицированного полипептида PH20 включает P (или консервативную относительно него аминокислоту) в позиции, соответствующей позиции 204 в полипептиде PH20, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Таким образом, в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые проявляют увеличенную стабильность в присутствии фенольного консерванта, содержащие аминокислотную замену в полипептиде PH20, которая опосредует увеличенную стабильность, где стабильность увеличена по сравнению с не модифицированным полипептидом без аминокислотной замены, и не модифицированный полипептид PH20 обладает последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, или представляет собой ее укороченный с С-конца фрагмент, который представляет собой растворимый полипептид PH20, или обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с указанной последовательностью. Например, не модифицированный полипептид PH20 представляет собой растворимый полипептид PH20, который обладает последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66. В конкретных примерах модифицированный полипептид PH20 обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. В любом из таких примеров модифицированного полипептида PH20 полипептид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 или более замен аминокислот. В примерах в настоящем документе модифицированный полипептид PH20 представляет собой PH20 человека. Модифицированный полипептид PH20 проявляет стабильность в присутствии фенольного консерванта, если он проявляет по меньшей мере 15% гиалуронидазной активности в присутствии консерванта (консервантов) в течение по меньшей мере 4 ч по сравнению с гиалуронидазной активностью в отсутствие фенольного консерванта (консервантов), где актив-

ность сравнивают при одинаковых условиях за исключением присутствия фенольного консерванта (консервантов). В любом из описанных выше примеров модифицированный полипептид PH20 является стабильным в присутствии эффективного против микроорганизмов количества одного или более фенольных консервантов, где общее количество одного или более фенольных консервантов в виде процента (%) концентрации по массе (масса/объем) представляет собой или представляет собой примерно от 0,05 до 0,6%, от 0,1 до 0,4%, от 0,1 до 0,3%, от 0,15 до 0,325%, от 0,15 до 0,25%, от 0,1 до 0,2%, от 0,2 до 0,3% или от 0,3 до 0,4% включительно. Фенольный консервант может представлять собой фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт или парабен, такой как м-крезол, фенол, или м-крезол и фенол. Аминокислотная замена может представлять собой замену аминокислотного остатка 204, 58, 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 или 445 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3. Например, аминокислотная замена представляет собой G в позиции, соответствующей позиции 10; K в позиции, соответствующей позиции 12; S в позиции, соответствующей позиции 20; T в позиции, соответствующей позиции 22; M в позиции, соответствующей позиции 26; W в позиции, соответствующей позиции 34; N в позиции, соответствующей позиции 36; L в позиции, соответствующей позиции 46; M в позиции, соответствующей позиции 50; T в позиции, соответствующей позиции 52; S в позиции, соответствующей позиции 52; C в позиции, соответствующей позиции 58; K в позиции, соответствующей позиции 58; R в позиции, соответствующей позиции 58; N в позиции, соответствующей позиции 58; Y в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 58; H в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 68; V в позиции, соответствующей позиции 70; E в позиции, соответствующей позиции 74; L в позиции, соответствующей позиции 82; N в позиции, соответствующей позиции 82; V в позиции, соответствующей позиции 83; Q в позиции, соответствующей позиции 83; S в позиции, соответствующей позиции 83; G в позиции, соответствующей позиции 83; N в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; K в позиции, соответствующей позиции 86; E в позиции, соответствующей позиции 97; L в позиции, соответствующей позиции 97; R в позиции, соответствующей позиции 127; R в позиции, соответствующей позиции 131; L в позиции, соответствующей позиции 138; K в позиции, соответствующей позиции 142; N в позиции, соответствующей позиции 142; P в позиции, соответствующей позиции 142; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; G в позиции, соответствующей позиции 143; K в позиции, соответствующей позиции 143; T в позиции, соответствующей позиции 144; Q в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 169; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; N в позиции, соответствующей позиции 195; E в позиции, соответствующей позиции 196; R в позиции, соответствующей позиции 196; P в позиции, соответствующей позиции 204; A в позиции, соответствующей позиции 205; E в позиции, соответствующей позиции 205; I в позиции, соответствующей позиции 206; A в позиции, соответствующей позиции 213; I в позиции, соответствующей позиции 219; M в позиции, соответствующей позиции 234; T в позиции, соответствующей позиции 237; H в позиции, соответствующей позиции 238; Q в позиции, соответствующей позиции 240; V в позиции, соответствующей позиции 249; A в позиции, соответствующей позиции 261; K в позиции, соответствующей позиции 261; T в позиции, соответствующей позиции 267; K в позиции, соответствующей позиции 277; H в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 291; E в позиции, соответствующей позиции 309; Q в позиции, соответствующей позиции 310; Y в позиции, соответствующей позиции 314; Y в позиции, соответствующей позиции 315; N в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; D в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции, соответствующей позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 375; R в позиции, соответствующей позиции 376; V в позиции, соответствующей позиции 399; E в позиции, соответствующей позиции 401; A в позиции, соответствующей позиции 407; L в позиции, соответствующей позиции 416; K в позиции, соответствующей позиции 419; H в позиции, соответствующей позиции 421; E в позиции, соответствующей позиции 431; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; C в позиции, соответствующей позиции 439; P в позиции, соответствующей позиции 440; G в позиции, соответствующей позиции 443; или N в позиции, соответствующей позиции 445, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. В частности, аминокислотная замена представляет собой T в позиции, соответствующей позиции 52, K в позиции, соответствующей позиции 58, R в позиции, соответствующей позиции 58, P в позиции, соответствующей позиции 68, V в позиции, соответствующей позиции 83, P в позиции, соответствующей позиции 204, A в позиции, соответствующей позиции 261, T в позиции, соответствующей позиции 267, K в позиции, соответствующей позиции 277 или H в позиции, соответствующей позиции 421, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID

NO: 3, например замену на Р в позиции, соответствующей позиции 204, или на R в позиции, соответствующей позиции 58. Модифицированный полипептид РН20, который проявляет увеличенную стабильность к фенольному консерванту, может быть, по существу, очищенным или выделенным. Модифицированный полипептид РН20, который проявляет увеличенную стабильность к фенольному консерванту, может быть модифицирован гликозилированием, сиалированием, альбуминированием, фарнезилированием, карбоксилированием, гидроксильным и фосфорилированием, и, как правило, является гликозилированным, где полипептид содержит, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент, присоединенный к каждому по меньшей мере из трех остатков аспарагина (N), таких как аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам 200, 333 и 358 из SEQ ID NO: 3. Модифицированный полипептид РН20, который проявляет увеличенную стабильность к фенольному консерванту, может быть конъюгирован с полимером, таким как PEG или декстран, и/или может быть конъюгирован с фрагментом, который представляет собой домен мультимеризации, токсин, обнаруживаемую метку или лекарство.

Модифицированные полипептиды РН20, предусмотренные в настоящем документе, которые проявляют увеличенную стабильность, включают полипептиды, которые проявляют увеличенную гиалуронидазную активность при повышенной температуре по сравнению с полипептидом РН20, не содержащим аминокислотную замену (замены), например по меньшей мере 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500% или большую гиалуронидазную активность в течение по меньшей мере 4 ч по сравнению с полипептидом РН20, не содержащим аминокислотную замену (замены). Также полипептиды включают полипептиды, которые проявляют активность, но также, как правило, проявляют увеличенную стабильность или другое свойство при повышенной температуре, такие как модифицированный полипептид РН20, который проявляет по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500% гиалуронидазной активности в течение по меньшей мере 4 ч при температуре между или примерно между 32 и 37°C по сравнению с гиалуронидазной активностью модифицированного полипептида РН20 при температуре между или примерно между 2 и 8°C, где активность сравнивают при одинаковых условиях за исключением отличия температуры. Гиалуронидазная активность может проявляться после по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней, 3, 4 недель или более при повышенной температуре между или примерно между 32 и 37°C по сравнению с гиалуронидазной активностью модифицированного полипептида РН20 при температуре между или примерно между 2 и 8°C, где активность сравнивают в течение одинакового периода времени и при одинаковых условиях за исключением отличия температуры. Примеры таких модифицированных полипептидов представляют собой полипептиды, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в аминокислотной позиции, соответствующей позиции, выбранной из 1, 11, 12, 14, 20, 26, 29, 34, 50, 58, 70, 82, 83, 84, 86, 87, 140, 142, 143, 147, 152, 166, 167, 172, 174, 178, 193, 195, 206, 212, 213, 219, 233, 237, 240, 267, 277, 291, 292, 309, 313, 314, 317, 318, 347, 367, 368, 371, 374, 389, 392, 395, 396, 406, 419, 421, 439 и 443 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида РН20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3. Примеры мутаций включают, например, замену на R в позиции, соответствующей позиции 1; S в позиции, соответствующей позиции 11; I в позиции, соответствующей позиции 12; V в позиции, соответствующей позиции 14; S в позиции, соответствующей позиции 20; M в позиции, соответствующей позиции 26; R в позиции, соответствующей позиции 29; W в позиции, соответствующей позиции 34; M в позиции, соответствующей позиции 50; K в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; V в позиции, соответствующей позиции 70; L в позиции, соответствующей позиции 82; Q в позиции, соответствующей позиции 83; R в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; S в позиции, соответствующей позиции 87; K в позиции, соответствующей позиции 140; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; K в позиции, соответствующей позиции 143; S в позиции, соответствующей позиции 147; T в позиции, соответствующей позиции 152; T в позиции, соответствующей позиции 166; D в позиции, соответствующей позиции 167; A в позиции, соответствующей позиции 172; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; R в позиции, соответствующей позиции 178; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; I в позиции, соответствующей позиции 206; S в позиции, соответствующей позиции 212; A в позиции, соответствующей позиции 213; I в позиции, соответствующей позиции 219; G в позиции, соответствующей позиции 233; T в позиции, соответствующей позиции 237; A в позиции, соответствующей позиции 240; Q в позиции, соответствующей позиции 240; T в позиции, соответствующей позиции 267; E в позиции, соответствующей позиции 277; S в позиции, соответствующей позиции 291; H в позиции, соответствующей позиции 292; V в позиции, соответствующей позиции 292; S в позиции, соответствующей позиции 309; H в позиции, соответствующей позиции 313; S в позиции, соответствующей позиции 314; I в позиции, соответствующей позиции 317; T в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; R в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции, соответствующей позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 368; S в позиции, соответствующей по-

зиции 371; Р в позиции, соответствующей позиции 374; А в позиции, соответствующей позиции 389; V в позиции, соответствующей позиции 392; А в позиции, соответствующей позиции 395; Н в позиции, соответствующей позиции 396; N в позиции, соответствующей позиции 406; Н в позиции, соответствующей позиции 419; К в позиции, соответствующей позиции 419; R в позиции, соответствующей позиции 421; S в позиции, соответствующей позиции 421; А в позиции, соответствующей позиции 439; С в позиции, соответствующей позиции 439; и G в позиции, соответствующей позиции 443, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. В конкретных примерах, предусмотренных в настоящем документе, любой из таких модифицированных полипептидов PH20 содержит одну аминокислотную модификацию, такую как замену, и комбинации модификаций, например по меньшей мере или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и более модификаций. Модификация, такая как замена, может быть введена в не модифицированный полипептид PH20, который обладает последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, или который представляет собой его укороченный с С-конца фрагмент, который представляет собой растворимый полипептид PH20, такой как приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или который обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, любой из таких модифицированных полипептидов PH20 обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

Также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые проявляют увеличенную стабильность в условиях низкого содержания соли, таких как, например, концентрации NaCl менее чем 100 мМ, включая, но не ограничиваясь концентрациями NaCl менее чем 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 мМ или менее. Модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды, которые проявляют увеличенную гиалуронидазную активность при более низкой концентрациях соли по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены). Такая активность включает, например, по меньшей мере более чем 100% или по меньшей мере 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500% или большую гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены). Примеры таких модифицированных полипептидов PH20 представляют собой полипептиды, которые проявляют по меньшей мере 60% гиалуронидазной активности при низкой концентрации соли, такой как между или примерно между 10 и 100 мМ NaCl включительно (или сравнимые концентрации других солей или смесей солей), по сравнению с гиалуронидазной активностью модифицированного полипептида PH20 в 150 мМ NaCl, где активности сравнивают при одинаковых условиях за исключением отличия концентрации соли. В конкретных примерах, предусмотренных в настоящем документе, любые такие модифицированные полипептиды PH20 содержат одну аминокислотную модификацию, такую как замена, и комбинацию модификаций, например, по меньшей мере или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и более модификаций. Модификация, такая как замена, может быть введена в не модифицированный полипептид PH20, который обладает последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, или который представляет собой его укороченный с С-конца фрагмент, который представляет собой растворимый полипептид PH20, такой как приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или который обладает, по меньшей мере, 85% идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, любые такие модифицированные полипептиды PH20 обладают по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

Также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в полипептиде PH20, где модифицированный полипептид PH20 проявляет увеличенную гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену. При сравнении активности полипептидов активность сравнивают при одинаковых условиях. Указанные полипептиды включают полипептиды, где не модифицированный PH20 проявляет по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3, или где полученные модифицированные PH20 проявляют такую идентичность последовательности по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3. Примеры таких модифицированных полипептидов PH20 представляют собой любые полипептиды, которые содержат аминокислотную замену (замены) в последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69 или 72, или в последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69 или 72. Аминокислотная замена (замены) также может быть введена в последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 857, 859, 861 или 870, или в последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NOS: 857, 859, 861 или 870. В частности, в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые содержат аминокислотную замену в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. Модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды, которые проявляют по меньшей мере 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000,

4000, 5000% или большую гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену. Активность может быть оценена при любой температуре, в частности такая активность проявляется, когда гиалуронидаза подвергается температуре между или примерно между 2 и 8°C. Указанные модифицированные полипептиды PH20 содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в аминокислотной позиции, соответствующей позиции, выбранной из 1, 12, 15, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 39, 46, 48, 52, 58, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 84, 86, 87, 92, 93, 94, 97, 118, 120, 127, 131, 135, 141, 142, 147, 148, 150, 151, 152, 155, 156, 163, 164, 165, 166, 169, 170, 174, 198, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 233, 234, 236, 238, 247, 257, 259, 260, 261, 263, 269, 271, 272, 276, 277, 278, 282, 291, 293, 305, 308, 309, 310, 313, 315, 317, 318, 320, 324, 325, 326, 328, 347, 353, 359, 371, 377, 380, 389, 392, 395, 399, 405, 407, 409, 410, 418, 419, 421, 425, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445, 446 и 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3. Примеры модификаций включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены на гистидин (H) в позиции, соответствующей позиции 1; Q в позиции, соответствующей позиции 1; E в позиции, соответствующей позиции 12; T в позиции, соответствующей позиции 12; V в позиции, соответствующей позиции 15; E в позиции, соответствующей позиции 24; H в позиции, соответствующей позиции 24; E в позиции, соответствующей позиции 26; K в позиции, соответствующей позиции 26; K в позиции, соответствующей позиции 27; R в позиции, соответствующей позиции 27; E в позиции, соответствующей позиции 29; I в позиции, соответствующей позиции 29; L в позиции, соответствующей позиции 29; M в позиции, соответствующей позиции 29; P в позиции, соответствующей позиции 29; S в позиции, соответствующей позиции 29; V в позиции, соответствующей позиции 29; G в позиции, соответствующей позиции 30; H в позиции, соответствующей позиции 30; K в позиции, соответствующей позиции 30; M в позиции, соответствующей позиции 30; R в позиции, соответствующей позиции 30; S в позиции, соответствующей позиции 30; A в позиции, соответствующей позиции 31; C в позиции, соответствующей позиции 31; H в позиции, соответствующей позиции 31; I в позиции, соответствующей позиции 31; K в позиции, соответствующей позиции 31; L в позиции, соответствующей позиции 31; P в позиции, соответствующей позиции 31; R в позиции, соответствующей позиции 31; S в позиции, соответствующей позиции 31; T в позиции, соответствующей позиции 31; V в позиции, соответствующей позиции 31; F в позиции, соответствующей позиции 32; G в позиции, соответствующей позиции 32; H в позиции, соответствующей позиции 32; W в позиции, соответствующей позиции 33; F в позиции, соответствующей позиции 37; N в позиции, соответствующей позиции 39; T в позиции, соответствующей позиции 39; R в позиции, соответствующей позиции 46; F в позиции, соответствующей позиции 48; H в позиции, соответствующей позиции 48; N в позиции, соответствующей позиции 48; Q в позиции, соответствующей позиции 52; K в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; W в позиции, соответствующей позиции 63; V в позиции, соответствующей позиции 67; H в позиции, соответствующей позиции 68; Q в позиции, соответствующей позиции 68; A в позиции, соответствующей позиции 69; C в позиции, соответствующей позиции 69; F в позиции, соответствующей позиции 69; G в позиции, соответствующей позиции 69; I в позиции, соответствующей позиции 69; L в позиции, соответствующей позиции 69; M в позиции, соответствующей позиции 69; P в позиции, соответствующей позиции 69; R в позиции, соответствующей позиции 69; W в позиции, соответствующей позиции 69; Y в позиции, соответствующей позиции 69; A в позиции, соответствующей позиции 70; C в позиции, соответствующей позиции 70; F в позиции, соответствующей позиции 70; G в позиции, соответствующей позиции 70; H в позиции, соответствующей позиции 70; K в позиции, соответствующей позиции 70; L в позиции, соответствующей позиции 70; N в позиции, соответствующей позиции 70; P в позиции, соответствующей позиции 70; R в позиции, соответствующей позиции 70; S в позиции, соответствующей позиции 70; T в позиции, соответствующей позиции 70; V в позиции, соответствующей позиции 70; R в позиции, соответствующей позиции 71; S в позиции, соответствующей позиции 71; M в позиции, соответствующей позиции 72; Q в позиции, соответствующей позиции 72; H в позиции, соответствующей позиции 73; L в позиции, соответствующей позиции 73; W в позиции, соответствующей позиции 73; A в позиции, соответствующей позиции 74; C в позиции, соответствующей позиции 74; G в позиции, соответствующей позиции 74; N в позиции, соответствующей позиции 74; P в позиции, соответствующей позиции 74; R в позиции, соответствующей позиции 74; S в позиции, соответствующей позиции 74; V в позиции, соответствующей позиции 74; W в позиции, соответствующей позиции 74; F в позиции, соответствующей позиции 75; L в позиции, соответствующей позиции 75; R в позиции, соответствующей позиции 75; T в позиции, соответствующей позиции 75; G в позиции, соответствующей позиции 84; R в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; C в позиции, соответствующей позиции 87; T в позиции, соответствующей позиции 87; Y в позиции, соответствующей позиции 87; C в позиции, соответствующей позиции 92; I в позиции, соответствующей позиции 93; L в позиции, соответствующей позиции 93; R в позиции, соответствующей позиции 93; T в позиции, соответствующей позиции 93; R в позиции, соответствующей позиции 94; G в позиции, соответствующей позиции 97; Q в позиции, соответствующей позиции 118; F в позиции, соответствующей позиции 120; V в позиции, соответствующей позиции 120; Y в позиции, соответствующей пози-

вующей позиции 399; W в позиции, соответствующей позиции 399; G в позиции, соответствующей позиции 405; D в позиции, соответствующей позиции 407; Q в позиции, соответствующей позиции 407; A в позиции, соответствующей позиции 409; Q в позиции, соответствующей позиции 409; T в позиции, соответствующей позиции 410; P в позиции, соответствующей позиции 418; F в позиции, соответствующей позиции 419; I в позиции, соответствующей позиции 419; K в позиции, соответствующей позиции 419; R в позиции, соответствующей позиции 419; S в позиции, соответствующей позиции 419; H в позиции, соответствующей позиции 421; K в позиции, соответствующей позиции 421; N в позиции, соответствующей позиции 421; Q в позиции, соответствующей позиции 421; R в позиции, соответствующей позиции 421; S в позиции, соответствующей позиции 421; K в позиции, соответствующей позиции 425; A в позиции, соответствующей позиции 431; H в позиции, соответствующей позиции 431; K в позиции, соответствующей позиции 431; Q в позиции, соответствующей позиции 431; R в позиции, соответствующей позиции 431; S в позиции, соответствующей позиции 431; V в позиции, соответствующей позиции 431; L в позиции, соответствующей позиции 433; R в позиции, соответствующей позиции 433; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; K в позиции, соответствующей позиции 436; I в позиции, соответствующей позиции 437; M в позиции, соответствующей позиции 437; T в позиции, соответствующей позиции 438; V в позиции, соответствующей позиции 439; H в позиции, соответствующей позиции 440; R в позиции, соответствующей позиции 440; F в позиции, соответствующей позиции 441; R в позиции, соответствующей позиции 442; A в позиции, соответствующей позиции 443; M в позиции, соответствующей позиции 443; M в позиции, соответствующей позиции 445; P в позиции, соответствующей позиции 445; A в позиции, соответствующей позиции 446; D в позиции, соответствующей позиции 447; N в позиции, соответствующей позиции 447; и/или на Q в позиции, соответствующей позиции 447, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Полипептиды, которые проявляют увеличенную гиалуронидазную активность, включают полипептиды, которые проявляют по меньшей мере в 2 раза большую гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену. Например, полипептиды включают модифицированные полипептиды PH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в аминокислотной позиции, соответствующей позиции, выбранной из позиций 24, 29, 31, 48, 58, 69, 70, 75, 84, 97, 165, 166, 271, 278, 317, 320, 325 и 326, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3, например модифицированные полипептиды PH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены на E в позиции, соответствующей позиции 24; E в позиции, соответствующей позиции 29; V в позиции, соответствующей позиции 31; N в позиции, соответствующей позиции 48; K в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; A в позиции, соответствующей позиции 69; F в позиции, соответствующей позиции 69; G в позиции, соответствующей позиции 69; P в позиции, соответствующей позиции 69; R в позиции, соответствующей позиции 69; A в позиции, соответствующей позиции 70; F в позиции, соответствующей позиции 70; G в позиции, соответствующей позиции 70; G в позиции, соответствующей позиции 70; H в позиции, соответствующей позиции 70; H в позиции, соответствующей позиции 70; N в позиции, соответствующей позиции 70; R в позиции, соответствующей позиции 70; T в позиции, соответствующей позиции 70; V в позиции, соответствующей позиции 70; L в позиции, соответствующей позиции 75; T в позиции, соответствующей позиции 75; G в позиции, соответствующей позиции 84; G в позиции, соответствующей позиции 97; D в позиции, соответствующей позиции 165; L в позиции, соответствующей позиции 166; R в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 271; H в позиции, соответствующей позиции 278; R в позиции, соответствующей позиции 278; K в позиции, соответствующей позиции 317; K в позиции, соответствующей позиции 320; E в позиции, соответствующей позиции 325, с G в позиции, соответствующей позиции 325; K в позиции, соответствующей позиции 325; N в позиции, соответствующей позиции 325; Q в позиции, соответствующей позиции 325; и V в позиции, соответствующей позиции 326; со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Предусмотренные в настоящем документе полипептиды, которые проявляют увеличенную гиалуронидазную активность, включают любые такие модифицированные полипептиды PH20, которые содержат одну аминокислотную модификацию, такую как замена, и комбинации модификаций, например, по меньшей мере или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и более модификаций. Модификация, такая как замена, может быть введена в не модифицированный полипептид PH20, который обладает последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, или который представляет собой его укороченный с C-конца фрагмент, который представляет собой растворимый полипептид PH20, такой как приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или который обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, любые такие модифицированные полипептиды PH20 обладают по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3.

Также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в полипептиде PH20, последовательность кото-

рого приведена в SEQ ID NO: 7, в его укороченном с С-конца фрагменте, в его растворимом фрагменте или в полипептиде PH20, которые обладает последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 91% идентична последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, где по меньшей мере одна аминокислотная замена (замены) представляет собой замену в аминокислотной позиции, соответствующей позиции, выбранных аминокислотных позиций 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192, 193, 195, 196, 197, 198, 200, 202, 204, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251, 253, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 297, 298, 300, 301, 302, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 331, 334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351, 353, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 385, 387, 388, 389, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 403, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 425, 426, 427, 428, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 и 447, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3 или 7, где соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3; при условии, что, если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 13, 47, 131 или 219, замены представляет собой замены не на аланин (А). Указанные модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды, которые проявляют по меньшей мере 40% гиалуронидазной активности полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену, где, как и во всех вариантах в настоящем документе, активность сравнивают при одинаковых условиях.

Указанные полипептиды включают полипептиды, которые содержат аминокислотную замену в последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 и 72, или в последовательности аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 91% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. В частности, модифицированный полипептид PH20 содержит замены аминокислот в SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 или 72, которые представляют собой полипептиды, которые представляют собой укороченные с С-конца фрагменты SEQ ID NO: 7, или в полипептиде PH20, который обладает последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 91% идентична по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7. В частности, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 включают любые полипептиды, в которых аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, приведенную в табл. 3 ниже. Например, таких модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды, которые имеют, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в аминокислотной позиции соответствующей позиции, выбранной из аминокислотных позиций 1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 58, 59, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 79, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 97, 102, 104, 107, 114, 118, 120, 127, 128, 130, 131, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 156, 158, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 178, 179, 193, 195, 196, 198, 204, 205, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 220, 221, 222, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 247, 248, 249, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 276, 277, 278, 279, 282, 283, 285, 287, 289, 291, 292, 293, 298, 305, 307, 308, 309, 310, 313, 314, 315, 317, 318, 320, 321, 324, 325, 326, 328, 335, 347, 349, 351, 353, 356, 359, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 380, 381, 383, 385, 389, 392, 393, 395, 396, 399, 401, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 412, 416, 418, 419, 421, 425, 427, 428, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 или 447, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Примеры таких полипептидов с заменами включают полипептиды, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены на гистидин (H) в позиции, соответствующей позиции 1; А в позиции, соответствующей позиции 1; Е в позиции, соответствующей позиции 1; G в позиции, соответствующей позиции 1; К в позиции, соответствующей позиции 1; Q в позиции, соответствующей позиции 1; R в позиции, соответствующей позиции 1; А в позиции, соответствующей позиции 6; М в позиции, соответствующей позиции 8; Q в позиции, соответствующей позиции 9; G в позиции, соответствующей позиции 10; Н в позиции, соответствующей позиции 10; S в позиции, соответствующей позиции 11; Е в позиции, соответствующей позиции 12; I в позиции, соответствующей позиции 12; К в позиции, соответствующей позиции 12; Т в позиции, соответствующей позиции 12; V в позиции, соответствующей позиции 14; V в позиции, соответствующей позиции 15; М в позиции, соответствующей позиции 15; S в позиции, соответствующей позиции 20; Т в позиции, соответствующей позиции 22; Е в позиции, соответствующей позиции 24; Н в позиции, соответствующей позиции 24; R в позиции, соответствующей позиции 24; А в позиции,

позиции, соответствующей позиции 439; Т в позиции, соответствующей позиции 439; V в позиции, соответствующей позиции 439; D в позиции, соответствующей позиции 440; Н в позиции, соответствующей позиции 440; М в позиции, соответствующей позиции 440; Р в позиции, соответствующей позиции 440; R в позиции, соответствующей позиции 440; S в позиции, соответствующей позиции 440; А в позиции, соответствующей позиции 441; F в позиции, соответствующей позиции 441; С в позиции, соответствующей позиции 442; G в позиции, соответствующей позиции 442; R в позиции, соответствующей позиции 442; А в позиции, соответствующей позиции 443; E в позиции, соответствующей позиции 443; F в позиции, соответствующей позиции 443; G в позиции, соответствующей позиции 443; M в позиции, соответствующей позиции 443; N в позиции, соответствующей позиции 443; E в позиции, соответствующей позиции 444; H в позиции, соответствующей позиции 444; V в позиции, соответствующей позиции 444; H в позиции, соответствующей позиции 445; M в позиции, соответствующей позиции 445; N в позиции, соответствующей позиции 445; P в позиции, соответствующей позиции 445; Q в позиции, соответствующей позиции 445; S в позиции, соответствующей позиции 445; T в позиции, соответствующей позиции 445; V в позиции, соответствующей позиции 445; W в позиции, соответствующей позиции 445; A в позиции, соответствующей позиции 446; M в позиции, соответствующей позиции 446; W в позиции, соответствующей позиции 446; D в позиции, соответствующей позиции 447; E в позиции, соответствующей позиции 447; G в позиции, соответствующей позиции 447; I в позиции, соответствующей позиции 447; N в позиции, соответствующей позиции 447; P в позиции, соответствующей позиции 447; Q в позиции, соответствующей позиции 447; T в позиции, соответствующей позиции 447, и/или замены на V в позиции, соответствующей позиции 447, где каждая замена приведена со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Указанные модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды, которые проявляют по меньшей мере 40% активности PH20, которая не содержит конкретной аминокислотной замены. Активность может варьировать между, например, 40 и 5000%, 40 и 2000%, 40 и 1000%, 40 и 500%, 40 и 100%, 80 и 2000%, 80 и 600%, 80 и 200%, 80 и 300% гиалуронидазной активности полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену. Такая активность включает по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000% или большую гиалуронидазную активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену, где, как и во всех вариантах в настоящем документе, активность сравнивают при одинаковых условиях.

В частности в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, которые содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в полипептиде PH20, приведенном в SEQ ID NO: 7, или в его укороченном с С-конца фрагменте, или в полипептиде PH20, который обладает последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 91% идентична по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7, или в его соответствующем укороченном фрагменте, где модифицированные полипептиды PH20 проявляют менее чем 20% гиалуронидазной активности полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену, где активности сравнивают при одинаковых условиях; аминокислотная замена (замены) представляет собой замену в аминокислотной позиции, соответствующей позиции, выбранной из аминокислотных позиций 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, или 447, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3 или 7; соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3; при условии, что

(i) если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 200, 333, 358 или 393, замена представляет собой замену не на аланин (А),

(ii) если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 111 или 249, замена представляет собой замену не на аспарагин (N);

(iii) если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 113, замена представляет собой замену не на глутамин (Q);

(iv) если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 176, замена представляет собой замену не на глицин (G); и

(v) если модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей позиции 252, замена представляет собой замену не на треонин (T).

Примерами таких модифицированных полипептидов PH20 являются любые полипептиды, содержащие аминокислотную замену (замены) в последовательности аминокислот полипептида PH20, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в последовательности аминокислот, которая обладает по меньшей мере 91% идентичностью последовательности с любой последовательностью, приведенной в SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. Например, модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену (замены) в SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, которые представляют собой полипептиды, являющиеся укороченными с С-конца фрагментами SEQ ID NO: 7 или полипептида PH20, имеющего последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 91% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 7. В приведенных в настоящем документе примерах таких модифицированных полипептидов PH20, модифицированные полипептиды PH20 могут обладать сходной или такой же активностью, как и PH20, не имеющий модификаций, или могут обладать повышенной активностью или активностью, которая не более чем на 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05% меньше гиалуронидазной активности полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену. Примеры таких модифицированных полипептидов PH20 приведены в табл. 5.

Среди любых и всех модифицированных полипептидов PH20, предусмотренных в настоящем документе и выше, модифицированный полипептид PH20 представляет собой полипептид, который не содержит последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 6-66, 69-72, 856-861, 869 или 870. В частности, любые модифицированные полипептиды PH20, предусмотренные в настоящем документе выше или в любом другом месте, представляют собой любые полипептиды PH20, которые содержат аминокислотную замену (замены) в полипептиде PH20, имеющем последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 3, 7, 69 или 72, при условии, что

(i) если модифицированный полипептид PH20 имеет единственную аминокислотную замену, замена не соответствует аминокислотным заменам V12A, N47A, D111N, E113Q, N131 A, R176G, N200A, N219A, E249Q, R252T, N333A или N358A, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3;

(ii) если модифицированный полипептид PH20 имеет только две аминокислотные замены, замены не соответствуют аминокислотным заменам P13A/L464W, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N219A или N333A/N358A, со ссылкой на позиции, приведенные в SEQ ID NO: 3; и

(iii) если модифицированный полипептид PH20 имеет только три аминокислотные замены, замены не соответствуют аминокислотным заменам N47A/N131A/N219A, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Любые из вышеуказанных модифицированных полипептидов PH20, предусмотренных в настоящем документе и описанных выше и ниже, могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или большее число аминокислотных замен. Модифицированные полипептиды PH20 могут включать сигнальную последовательность, в том числе нативную последовательность, или гетерологичную последовательность, или модифицированную последовательность, и также включают зрелую форму полипептида PH20 без сигнальной последовательности.

Любые модифицированные полипептиды PH20, предусмотренные в настоящем документе выше или описанные ниже, представляют собой модифицированные полипептиды PH20, которые содержат или имеют последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 73-855, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 73-855, и которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, например, такую как любая из замен, описанных выше или в любом другом месте в настоящем документе со ссылкой на позиции по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3. В любом из примеров модифицированных полипептидов PH20, предусмотренных здесь, модифицированный полипептид PH20 не имеет или не содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 8-31, 69-72, 856-861, 869 или 870.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут быть, по существу, очищенными или выделенными, могут обладать каталитической активностью при нейтральном pH, могут секретироваться из клеток при экспрессии и растворяться в супернатанте, и/или могут иметь модифицированные аминокислоты, например, модификации могут быть выбраны из следующих: гликозилирование, сиалирование, альбуминирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидроксификация.

лирование, конъюгирование с полимером, например пегилирование или конъюгирование с декстраном, конъюгирование с другим фрагментом, например с доменом мультимеризации, токсином, обнаруживаемой меткой или лекарством, и фосфорилирование. Модифицированный полипептид РН20 может быть гликозилирован, например содержать по меньшей мере один фрагмент N-ацетилглюкозамина, связанный с каждым по меньшей мере из трех остатков аспарагина (N), где, например, три остатка аспарагина соответствуют аминокислотным остаткам 200, 333 и 358 в SEQ ID NO: 3. Домены мультимеризации включают домены Fc.

Также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20. Предусмотрены эукариотические и прокариотические векторы, которые содержат такие молекулы нуклеиновых кислот. Векторы включают векторы экспрессии и включают векторы млекопитающих, в том числе вирусные векторы. Вирусные векторы включают аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса простого герпеса и цитомегаловируса и другие такие вирусные векторы. Интерес представляют онколитические векторы, которые накапливаются в опухоли или направляются в них. Также предусмотрены клетки, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот и клетки, которые содержат векторы. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими, в частности клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО).

Также в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид РН20, который продуцируется в любых предусмотренных клетках. Таким образом, в настоящем документе предусмотрены способы получения модифицированного полипептида РН20 при культивировании любых предусмотренных в настоящем документе клеток в условиях, в которых кодируемый модифицированный полипептид РН20 продуцируется и секретируется клеткой, и способы выделения экспрессированного полипептида. Также в настоящем документе предусмотрен способ получения модифицированного полипептида РН20 путем введения любых предусмотренных в настоящем документе нуклеиновых кислот или любых предусмотренных в настоящем документе векторов в клетку, способную включать N-связанный сахаридный фрагмент в полипептид, способ культивирования клеток в условиях, в которых кодируемый модифицированный полипептид РН20 продуцируется и секретируется клеткой, и способ выделения экспрессированного полипептида. В таких примерах нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Культивируемая клетка может быть эукариотической клеткой, такой как клетка млекопитающих, например клетка яичника китайского хомячка (СНО).

Также в настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат любые предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 или любые предусмотренные в настоящем документе нуклеиновые кислоты или векторы. Композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм с другими агентами и/или с другими компонентами, такими как консерванты. Композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм таким образом, что компоненты, в частности РН20 и любой другой активный агент, сохраняют активность или являются стабильными в предварительно выбранных условиях. Кроме того, как описано в настоящем документе, полипептиды РН20 модифицированы таким образом, что они обладают повышенной стабильностью в различных условиях. Например, в настоящем документе предусмотрены композиции, в которых модифицированный полипептид РН20 стабилен (т.е. сохраняет активность, как описано в настоящем документе) при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно, в течение по меньшей мере 1 месяца, или стабилен при температуре или примерно при температуре от 30 до 42°C включительно, в течение по меньшей мере 3 дней. В настоящем документе предусмотрены композиции, в которых модифицированный полипептид РН20 в композиции стабилен при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно, в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 месяцев. Также предусмотрены композиции, в которых модифицированный полипептид РН20 в композиции стабилен при температуре или примерно при температуре от 30 до 42°C включительно, в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60 дней или больше. Фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты.

Условия, лекарственные формы, компоненты и модифицированный полипептид РН20 выбирают таким образом, чтобы достичь желаемой стабильности. Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм для непосредственного введения или могут требовать разбавления. Они могут быть составлены в виде лекарственных форм для многократного введения или однократного введения. Примеры композиций включают модифицированный РН20 в концентрации в диапазоне между или примерно между 0,1 и 100 мкг/мл, 1 и 50 мкг/мл или 1 и 20 мкг/мл, или 10 и 5000 ед/мл, 50 и 4000 ед/мл, 100 и 2000 ед/мл, 300 и 2000 ед/мл, 600 и 2000 ед/мл или 100 и 1000 ед/мл. Примеры солей включают NaCl в концентрации, например, меньше чем или примерно или 200, 180, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 или меньше, или между или примерно между 0,1 и 200 мМ, 0,1 и 100 мМ, 120 и 200 мМ, 10 и 50 мМ, 10 и 90 мМ, 80 и 200 мМ, 80 и 140 мМ, 50 и 100 мМ, 80 и 100 мМ, 50 и 80 мМ, 100 и 140 мМ или 120 и 140 мМ.

Фармацевтические композиции могут содержать эффективное против микроорганизмов количество

консерванта или смеси консервантов, например один, два, три, четыре или больше фенольных консервантов, не фенольных консервантов или фенольных консервантов и не фенольных консервантов, например, включая, но не ограничиваясь ими, фенол, м-крезол, метилпарабен, бензиловый спирт, тимеросал, бензалкония хлорид, 4-хлор-1-бутанол, хлоргексидин дигидрохлорид, хлоргексидин диглюконат, L-фенилаланин, ЭДТА, бронопол, фенилртутьацетат, глицерин, имидомочевину, хлоргексидин, натрия дегидроацетат, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, цетримид, бензетония хлорид, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен и любые их комбинации. Фенолы включают, например, фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт и парабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен. Эффективные против микроорганизмов концентрации одного или нескольких консервантов (выраженные в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем)) могут находиться в диапазоне между 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4% включительно. Примерами фармацевтических композиций являются фармацевтические композиции, в которых в качестве консервантов присутствуют фенол, м-крезол или фенол и м-крезол, и количество консерванта, выраженное в % концентрации по массе (масса/объем) в лекарственной форме, находится в диапазоне между или примерно между 0,1 и 0,25% для фенола и между или примерно между 0,05 и 0,2% для м-крезола, находится в диапазоне между или примерно между 0,10 и 0,2% для фенола и между или примерно между 0,6 и 0,18% для м-крезола, между или примерно между 0,1 и 0,15% для фенола и между или примерно между 0,8 и 0,15% для м-крезола, находится в диапазоне между или примерно между 0,10 и 0,15% для фенола и между или примерно между 0,06 и 0,09% для м-крезола, или находится в диапазоне между или примерно между 0,12 и 0,18% для фенола и между или примерно между 0,14 и 0,22% для м-крезола.

Фармацевтические композиции могут содержать дополнительный фармацевтически активный агент. Активный агент может быть включен в композицию или предусмотрен в комбинации с композицией, содержащей РН20, но в виде отдельной композиции для введения по отдельности, последовательно, с перерывом, одновременно или вместе. Терапевтически активные агенты могут включать, например, агент, выбранный из химиотерапевтического агента, болеутоляющего агента, противовоспалительного агента, противомикробного агента, противоамебного агента, противотрихомонадного агента, агента против болезни Паркинсона, противомаларийного агента, противосудорожного агента, антидепрессанта и противоревматического агента, противогрибкового агента, антигипертензивного агента, жаропонижающего агента, антипаразитарного агента, антигистаминного агента, альфа-адренергического агониста, альфа-блокатора, обезболивающего агента, бронхорасширяющего агента, биоцидного агента, бактерицидного агента, бактериостатического агента, бета-адренергического блокатора, блокатора кальциевых каналов, лекарственного агента для сердечнососудистой системы, противозачаточного агента, противозастойного агента, диуретического агента, успокоительного агента, диагностического агента, электролита, снотворного агента, гормонального агента, гипергликемического агента, мышечного релаксанта, мышечного контрактанта, офтальмологического агента, парасимпатомиметического агента, стимулянта, седативного агента, симпатомиметического агента, транквилизатора, почечного агента, вагинального агента, противовирусного агента, витамина, нестероидного противовоспалительного агента, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента, полипептида, белка, нуклеиновой кислоты, лекарства, органической молекулы и агента, способствующего засыпанию. Примерами таких агентов являются антитела, в частности моноклональные антитела, препараты иммуноглобулинов, бисфосфонаты, цитокины, химиотерапевтические агенты, факторы коагуляции и инсулины. Инсулины включают, например, базальный инсулин и быстродействующий инсулин, например регулярный инсулин, в частности рекомбинантный человеческий инсулин, и аналоги инсулина, такие как инсулин лизпро, инсулин аспарт или инсулин глизин. Конкретные быстродействующие инсулины представляют собой инсулины, в которых А цепь имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 862, и в которых В цепь имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 863, или представляют собой инсулин с А цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную в виде позиций аминокислотных остатков 88-108 в SEQ ID NO: 864, и В цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную в виде позиций аминокислотных остатков 25-54 в SEQ ID NO: 864, или представляют собой аналог инсулина, выбранный из инсулина, имеющего А цепь с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 862, и В цепь с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ NOS:865-867. Количество быстродействующего инсулина в композициях может быть определено эмпирическим путем, но, как правило, может составлять от 10 до 1000 ед/мл, от 50 до 500 ед/мл, от 100 до 1000 ед/мл или от 500 до 1000 ед/мл включительно.

В конкретных примерах в настоящем документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов РН20, который обладает повышенной стабильностью к фенольному консерванту, и инсулин, такой как быстродействующий инсулин. Модифицированные полипептиды РН20 и инсулин могут быть предусмотрены в терапевтически эффективных количествах. Например, в настоящем документе предусмотрена фармацевтическая композиция, которая содержит любой из предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов РН20, который обладает повышенной стабильностью к фенольному консерванту, в количестве, которое находится в диапазоне или примерно в диапазоне от 100 до 1000 ед/мл, и быст-

родействующий инсулин в количестве, которое находится в диапазоне или примерно в диапазоне от 10 до 1000 ед/мл. Например, быстродействующий инсулин может представлять собой аналог инсулина, такой как инсулин лизпро, инсулин аспарт или инсулин глулизин, или другой аналог. Любые из таких фармацевтических композиций могут быть составлены в виде лекарственных форм при pH в диапазоне или примерно в диапазоне от 7,0 до 7,6. Любые такие фармацевтические композиции также могут быть составлены в виде лекарственных форм таким образом, что содержат соль, такую как NaCl, в концентрации или примерно в концентрации от 0,1 до 200 мМ, и/или эффективное против микроорганизмов количество по меньшей мере одного консерванта, где композиция обычно содержит по меньшей мере один фенольный консервант. Эффективное против микроорганизмов количество представляет собой общее количество одного или нескольких консервантов, выраженное в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем), и составляет от 0,05 до 0,6%. Фенольные консерванты могут представлять собой фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт или парабен. В любом из вышеприведенных примеров фармацевтической композиции композиция также может содержать сурфактант, такой как полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, сорбит, полоксамер или полисорбат, в количестве, выраженном в % концентрации по массе (масса/объем) в лекарственной форме, которое составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 0,001%; буферный агент, который представляет собой агент, не связывающий металл, или агент, связывающий металл, такой как Трис, гистидин, фосфат или цитрат, при этом концентрация буферного агента находится в диапазоне между или примерно между 1 и 100 мМ; глицерин в концентрации менее 60 мМ; антиоксидант, такой как цистеин, триптофан или метионин, в концентрации между или примерно между 2 и 50 мМ включительно; и/или цинк в концентрации между или примерно между 0,001 и 0,1 мг на 100 единиц инсулина (мг/100 ед). Также в настоящем документе предусмотрены системы с обратной связью, инсулиновые помпы, в том числе помпы для постоянной подкожной инфузии инсулина (CSII) и инсулиновые шприцы-ручки, которые содержат любые предусмотренные здесь фармацевтические композиции. Фармацевтические композиции могут быть использованы в способах лечения диабета или применяться для лечения диабета, такого как сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа или гестационный диабет.

Другие терапевтические агенты в любой предусмотренной в настоящем документе фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими, адалимумаб, агалсидаза бета, алефацепт, ампициллин, анакинра, вакцины против полиомиелита, антиtimoцитарные агенты, азитромицин, бекаплермин, каспофунгин, цефазолин, цефепим, цефотетан, цефтазидим, цефтриаксон, цетуксимаб, циластатин, клавулановая кислота, клиндамицин, дарбэпоэтин альфа, даклизумаб, дифтерия, дифтерийный антитоксин, дифтерийный анатоксин, эфализумаб, эпинефрин, эритропоэтин альфа, этанерцепт, филграстим, флуконазол, фолликулостимулирующие гормоны, фоллитропин альфа, фоллитропин бета, фосфенитоин, гадолиамид, гадопентетат, гатифлоксацин, глатирамер, ГМ-КСФ, гозерелин, гозерелина ацетат, гранисетрон, Haemophilus influenza B, галоперидол, вакцины против гепатита, вакцины против гепатита А, вакцины против гепатита В, ибритумомаб тиуксетан, ибритумомаб, тиуксетан, иммуноглобулины, вакцина против Haemophilus influenza, противогриппозные вакцины, инфликсимаб, инсулин лизпро, 75% нейтральный протамин лизпро (NPL)/25% инсулин лизпро, 50% нейтральный протамин Хагедорна (NPH)/50% регулярный инсулин, 70% NPH/30% регулярный инсулин; регулярный инсулин, инсулин NPH, ультра инсулин, инсулин ультраленте и инсулин гларгин, интерфероны, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерферон алфакон, интерферон альфа-n, интерферон бета, интерферон бета-1а, интерферон гамма, интерферон альфакон, йодиксанол, йогексол, йопамидол, йоверсол, кеторолак, ларонидаза, левофлоксацин, лидокаин, линезолид, лоразепам, противокоревые вакцины, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вакцина против кори, эпидемического паротита и коревой краснухи, противокраснушные вакцины, медроксипрогестерон, меропенем, метилпреднизолон, мидазолам, морфин, октреотид, омализумаб, ондансетрон, паливизумаб, пантопразол, пэгаспаргаза, пэгфилграстим, пэг-интерферон альфа-2а, пэг-интерферона альфа-2b, пегвисомант, противокклюшные вакцины, пиперациллин, пневмококковые вакцины и конъюгированные пневмококковые вакцины, прометазин, ретеплаза, соматотропин, сульбактам, суматриптан, тазобактам, тенекеплаза, очищенные столбнячные анатоксины, тикарциллин, тозитумомаб, триамцинолон, триамцинолона ацетонид, триамцинолона гексацетонид, ванкомицин, иммуноглобулины для серотерапии ветряной оспы, вакцины против ветряной оспы, другие вакцины, алемтузумаб, алитретиноин, аллопуринол, альтретамин, амифостин, анастрозол, мышьяк, триоксид мышьяка, аспарагиназа, противотуберкулезные вакцины Кальметта-Герена (БЦЖ), живая вакцина БЦЖ, бексаротен, блеомицин, бусульфан, бусульфан для внутривенного введения, бусульфан для перорального применения, калустерон, капецитабин, карбоплатин, кармустин, кармустин с полифепрозаном, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитарабин, цитарабин липосомальный, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин липосомальный, даунорубицин, дауномицин, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, доцетаксел, доксорубицин, доксорубицин липосомальный, дромастанолон пропионат, раствор Elliott's B, эпирубицин, эпоэтин альфа, эстрамустин, этопозид, этопозид фосфат, этопозид VP-16, экземестан, флоксуринид, флударабин, фторурацил, 5-фторурацил, фулвестрант, гемцитабин, гемтузумаб, озогамин, гемтузумаб озогамин, гидроксимочевина, идарубицин, ифосфамид, иматиниб мезилат, иринотекан, летрозол, лейковорин, ле-

вамизол, ломустин, CCNU, мехлорэтамин, хлорметин, мегестрол, мегестрол ацетат, мелфалан, L-ПАМ, меркаптопурин, 6-меркаптопурин, месна, метотрексат, метоксален, митомицины, митомицин С, митотан, митоксантрон, нандролон, нандролон фенилпропионат, нофетумомаб, опрелвекин, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат, пегадемас, пентостатин, пипоброман, пликамицин, митрамицин порфимер, порфимер натрия, прокарбазин, акрихин, расбуриказа, ритуксимаб, сарграмостим, стрептозоцин, тальк, тамоксифен, темозоломид, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, 6-тиогуанин, триэтилентиофосфорамид (тиотепа), топотекан, торемифен, трастузумаб, третиноин, урамустин, валрубицин, винбластин, винкристин, винорелбин, золедронат, ацивицин, акларубицин, акодазол, акронин, адозелезин, алдеслейкин, ретиноевые кислоты, алитретиноин, 9-цис-ретиноевая кислота, альвоцидид, амбазон, амбомицин, аметантрон, аминоглутетимид, амсакрин, анаксирон, анцитабин, антрамицин, апазиквон, аргимесна, асперлин, аtrimустин, азациитидин, азетепа, азотомидин, баноксантрон, батабулин, батимастат, бенаксибин, бендамустин, бензодеп (Benzoder), бикалутаамид, бизтасерпин, бирикодар, бисантрен, биснафида димезилат, бизелезин, бортезомиб, бреквинар, бропиримином, будотитан, кактиномицин, канертиниб, карацемид, карбетимер, карбоквон, кармофур, карубицин, карзелезин, цедефингол, цемадотин (Cemadotin), хлорамбуцил, циотеронел, циролемицин, кланфенур, клофарабин, криснатол, декснитулдипин, дексормаплатин, дезагуанин, диазиквон, диброспидий, диенгест, диналин, дисермолид, дофеквидар (Dofequidar), доксифлуридин, дролоксифен, дуазомицин, экомустин, эдотрексат, эдотекарин, эфлорнитин, элакридар, элинафид, элсамитруцин, эмитефур, энлоплатин, энпромат, энзастаурин, эпипропидин, эпталопрост, эрбулозол, эзорубицин, этанидазол, этоглуцид, этоприн, эксисулинд, фадрозол, фазарабин, фенретинид, флюоксиместерон, фторцитабин, фосквидон, фостриецин, фотретамиин, галарубицин, галоцитабин, герохинол, гиматекан, гимерацил, глоксазон, глуфосфамид, илмофозин, иломастат, имексон, импросульфат, индисулам, инпроквон, интерлейкины, интерлейкин-2, рекомбинантные интерлейкины, интоплицин, йобенгуан, ипроплатин, ирсогладин, иксабепилон, кетотрексат, L-аланозин, ланреотид, латиниб, ледоксантрон, лейпролид, лейпрорелин, лексакальцитол, ларозол, лобаплатин, лометрексол, лонафарниб, лозоксантрон, луртотекан, мафосфамид, манносульфат, маримастат, масопротект, майтансин, мехлорэтамин, меленгестрол, мелфалан, меногарил, мепитиостан, метезинд, метомидат, метоприн, метуредеп, мибоплатин, мипроксифен, мизонидазол, митиндомид, митокарцин, митокромин, митофлаксон, митогиллин, митогуазон, митомалцин, митонафид, митоквидон, митоспер, митозоломид, мивобулин, мизорибин, мофаротен, мопидамол, мубритиниб, микофеноловая кислота, недаплатин, нейзарабин (Neizarabine), неморубицин, нитракрин, нокодазол, ногаламицин, нолатрексед, нортопиксантрон, ормаплатин, ортатаксел, отерацил, оксисуран, оксофенарсин, патупилон, пелдезин, пелиомицин, пелитрексол, пеметрексед, пентамустин, пепломицин, перфосфамид, перифозин, пикоплатин, пинафид, пипосульфат, пирфенидон, пироксантрон, пиксантрон, плевитрексед, племестан, порфирамицин, преднимустин, пропамидин, проспидий, пумитепа, пурамицин, пиразофуриин, ранимустин, рибоприн, ритросульфат, роглетимид, роквинимекс, руфокромомидин сабарубицин, сафингол, сатраплатин, себриплатин, семустин, семтразен, сизофиран, собузоксан, сорафениб, спарфозат, спарфозовая кислота, спарзомицин, спирогерманий, спиромустин, спироплатин, скваламин, стрептонириин, стрептоварицин, суфосфамид, сулофенур, тацедиалин, тализомицин, таллимустин, тариквидар, тауромустин, текогалан, тегафур, телоксантрон, темопорфин, тероксирон, тиамиприн (Thiamiprine), тиамиприн (Tiamiprine), тиазофуриин, тиломизол, тилорон, тимкодар, тиазолидин-4-карбоновая кислота (Timonacic), тирапазамин, топиксантрон, трабектедин, эктинэсайдин 743, трестолон, трицирибин, трилостан, триметрексед, триплатина тетранитрат, трипторелин, трофосфамид, тубулозол, убенимекс, уредеп, валсподар, вапреотид, вертепорфин, винбластин, виндезин, винепидин, винфлуниин, винформид, винглицинат, винлейцинол, винлейросин, винросидин, винтриптол, винзолидин, ворозол, ксантомицин А, гуамециклин, зениплатин, зиласкорб [2-Н], зиностаин, зорубицин, зосуквидар, ацетазоламид, ацикловир, адипиодон, алотрофлоксацин, альфентанил, алергенные экстракты, альфа 1-протеиназы ингибитор, алпростадиол, амикацин, аминокислоты, аминокaproновая кислота, аминофиллин, амитриптилин, амобарбитал, амринон, анальгетики, вакцины против полиомиелита, антирабическая сыворотка, противостолбнячные иммуноглобулины, противостолбнячные вакцины, антитромбин III, сыворотка против змеиного яда, аргатробан, аргинин, аскорбиновая кислота, атенолол, атракурий, атропин, ауортиоглюкоза, азатиоприн, азтреонам, бацитрацин, баклофен, базиликсимаб, бензойная кислота, бензтропин, бетаметазон, биотин, бивалирудин, ботулинические антитоксины, бретилий, буметанид, бупивакаин, бупренорфин, буторфанол, кальцитонин, кальцитриол, кальций, капреомицин, карбопрост, карнитин, цефамандол, цефоперазон, цефотаксим, цефокситин, цефтизоксим, цефуросксим, хлорамфеникол, хлорпрокаин, хлорохин, хлортиазид, хлорпромазин, хондроитинсерная кислота, хоригонадотропин альфа, хром, цидофовир, циметидин, ципрофлоксацин, цисатракурий, клофелин, кодеин, колхицин, колистин, коллаген, овечий кортикостероид трифлутат, кортикотропин, косинтропин, цианокобаламин, циклоспорин, цистеин, дакликсимаб, дальфопристин, далтепарин, данапароид, дантролен, дефероксамин, десмопрессин, дексаметазон, дексмететомидин, декспантенол, декстран, декстран железа, диатризолевая кислота, диазепам, диазоксид, дицикломин, дигибинд, дигоксин, дигидроэрготамин, дилтиазем, дифенгидрамин, дипиридазол, добутамин, допамин, доксакуриин, доксапрам, доксеркальциферол, доксициклин, дроперидол, дифиллин, эдетовая кислота, эдрофоний, эналаприлат, эфедрин, эпопростенол, эргокальциферол, эргоновин, эртапенем, эритромицин, эсмолол, эстрадиол, эстроге-

ны, этакриновая кислота, этаноламины, этанол, этиодизированные масла, этидроновая кислота, этомидат, фамотидин, фенолдопам, фентанил, флумазенил, фикозэритрины, флуфеназин, фолиевая кислота, фомепизол, фомивирсен, фондапаринукс, фоскарнет, фосфениитоин, фуросемид, гадотеридол, гадоверсетамид, ганцикловир, гентамицин, глюкагон, глюкоза, глицин, гликопирролат, гонадорелин, гонадотропин хорионический, полисахариды *Haemophilus B*, гемин, лекарственные препараты на основе трав, гистамины, гидралазин, гидрокортизон, гидроморфон, гидроксокобаламин, гидроксизин, гиосциамин, ибутилид, имиглюцераза, индигокармин, индометацин, йодиды, йопромид, иоталамическая кислота, йоксагловая кислота, иоксилан, изониазид, изопротеренол, вакцины против японского энцефалита, канамицин, кетамин, лабеталол, лепирудин, левобупивакаин, левотироксин, линкомицин, лиотиронин, лютеинизирующие гормоны, вакцины против болезни Лайма, мангафодипир, ментолы, менингококковые полисахаридные вакцины, меперидин, мепивакаин, мезоридазин, метараминол, метадон, метокарбамол, метогекситал, метилдопат, метилэргоновин, метоклопрамид, метопролол, метронидазол, миноциклин, мивакурий, смесь кислот из рыбьего жира, моксифлоксацин, муромонаб-CD3, микофенолата мофетил, нафциллин, нальбуфин, налмефен, налоксон, неостигмин, ниацинамид, никардипин, нитроглицерин, нитропруссид, норэпинефрин, орфенадрин, оксациллин, оксиморфон, окситетрациклин, панккуроний, пантенол, пантотеновая кислота, папаверин, ПЭГ-интерферон альфа 2А, пенициллин G, пентамидин, пентазоцин, пентобарбитал, перфлутрен, перфеназин, фенобарбитал, фентоламин, фенилэфрин, фениитоин, физостигмин, фитонадион, полимиксин, пралидоксим, прилокаин, прокаинамид, прокаин, прохлорперазин, прогестероны, пропранолол, пиридопиримидин гидроксид, пиридоксин, хинидин, хинупристин, антирабические иммуноглобулины, вакцины против бешенства, ранитидин, ремифентанил, рибофлавин, рифампицин, ропивакаин, самарий, скополамин, селен, серморелин, синкалид, соматрем, спектиномицин, стрептокиназа, стрептомицин, сукцинилхолин, суфентанил, сульфаметоксазол, такролимус, тербуталин, терипаратид, тестостерон, столбнячные антитоксины, тетракаин, тетрадецила сульфат, теofilлин, тиамин, тиэтилперазин, тиопентал, тиреостимулирующие гормоны, тинзапарин, тирофибан, тобрамицин, толазолин, толбутамид, торсемид, транексамовая кислота, трепростинил, трифлуоперазин, триметобензамид, триметоприм, трометамин, туберкулин, вакцины против брюшного тифа, урофоллитропин, урокиназа, вальпроевая кислота, вазопрессин, векуроний, верапамил, вориконазол, варфарин, вакцины против желтой лихорадки, зидовудин, цинк, зипразидона гидрохлорид, аклациномидин, актиномицин, адриамицин, азасерин, 6-азауридин, карцинофилин, хромомицин, деноптерин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, эноцитабин, флоксуридин, оливомицин, пирарубицин, пиритрексим, птероптерин, тегафур, туберцидин, алтеплаза, арцитумаб, бевацизумаб, ботулинический токсин типа А, ботулинический токсин типа В, капромаб пендетид, даклизумаб, дорназа альфа, дротрекогин альфа, имциромаб пентетат, йод-131, антибиотики; ингибитор ангиогенеза; вещества против катаракты и диабетической ретинопатии; ингибиторы карбоангидразы; мидриатики; агенты для фотодинамической терапии; аналоги простагландина; фактор роста; антинеопластические агенты; антимаболиты; противовирусные агенты; противоамебные и антипротозойные агенты; противотуберкулезные и противолепрозные агенты; антитоксины и антивенины; антигемофильный фактор, антиингибиторный коагулянтный комплекс, антитромбин III, фактор коагуляции V, фактор коагуляции IX, белковые фракции плазмы, фактор фон Виллебранда; антитромбоцитарный агент, колониестимулирующий фактор (CSF); стимулятор эритропоэза; кровоостанавливающие агенты и альбумины; иммуноглобулины; ингибиторы тромбина; антикоагулянты; стероидные противовоспалительные лекарства, выбранные из алклометазона, алгестона, беклометазона, бетаметазона, будезонида, клобетазола, клобетазона, клокортолона, клопреднола, кортикостерона, кортизона, кортивазола, дефлазакорта, дезонида, дезоксиметазона, дексаметазона, дифторазона, дифлукортолона, дифлупредната, эноксолон, флуазакорта, флулоронида, флуметазона, флунизолида, флуоцинолона, флуоцинонида, флуокортина, флуокортолона, флуорометолон, флуперолон, флупредниден, флупреднизолон, флурандренолида, флутиказона, формокортала, галцинонида, галобетазола, галометазона, галопредона, гидрокортамата, гидрокортизона, лотепреднола этабоната, мазипредона, медризона, мепреднизона, метилпреднизолон, мометазона фуората, параметазона, предникарбата, преднизолон, преднизона, преднивала, преднилидена, римексолон, тиксокортола и триамцинолона; докозанол, простагландины, аналоги простагландинов, антипростагландины и предшественники простагландинов; миотики, холинергики и антихолинэстеразы; и противоаллергические агенты.

Композиции и модифицированные полипептиды PH20 могут использоваться для лечения любого состояния, которое обычно лечат полипептидом PH20 или терапевтически активным агентом. Такие состояния включают, например, состояния, в которых гиалуронан играет важную роль в этиологии заболевания или ассоциирован с ним вследствие, например, накопления или чрезмерной продукции гиалуронана. Таким образом, в настоящем документе предусмотрены способы, применения композиций и модифицированные полипептиды PH20 для лечения ассоциированных с гиалуронаном заболеваний или состояний путем введения любого из предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов PH20 или композиций. Ассоциированные с гиалуронаном заболевания и состояния включают, например, воспалительное заболевание и опухоль или рак, в том числе рак на поздней стадии, метастатический рак и недифференцированный рак, например рак яичников, карциному *in situ* (ISC), плоскоклеточную карциному (SCC), рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак

легкого, рак молочной железы и рак толстой кишки. Полипептид РН20 может быть модифицирован с целью увеличения периода полувыведения для такого лечения. Например, полипептид РН20 может быть модифицирован полимером, таким как фрагмент PEG, для такого лечения.

Также предусмотрены способы для улучшения доставки терапевтического агента субъекту путем: введения субъекту любого из предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов РН20 или композиций, и введения терапевтического агента. Терапевтический агент можно вводить в той же самой композиции или отдельно или можно вводить до или после, с перерывом или одновременно с введением полипептида (полипептидов) РН20. Введение включает любой способ, в том числе внутривенное и подкожное введение, например, одновременно, с перерывом или после введения терапевтического агента. Терапевтические агенты включают любые агенты, приведенные выше или в любом другом месте в настоящем документе, и/или известные специалисту в данной области техники.

Также предусмотрены способы лечения избытка гликозаминогликанов; лечения опухоли; лечения накопления гликозаминогликанов в мозге; лечения сердечнососудистого расстройства; лечения офтальмологического расстройства; лечения легочного заболевания; увеличения проникновения химиотерапевтического агента в солидные опухоли; лечения целлюлита; лечения пролиферативного расстройства; или увеличения биодоступности лекарств и других терапевтических средств путем введения предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов РН20 или композиций.

Также предусмотрены фармацевтические композиции для применения в лечении ассоциированных с гиалуронатом заболеваний или расстройств; для доставки терапевтического агента субъекту; для лечения избытка гликозаминогликанов; для лечения опухоли; для лечения накопления гликозаминогликанов в мозге; для лечения сердечнососудистого расстройства; для лечения офтальмологического расстройства; для лечения легочного заболевания; для увеличения проникновения химиотерапевтического агента в солидные опухоли; для лечения целлюлита; для лечения пролиферативного расстройства; или для увеличения биодоступности лекарств и других терапевтических агентов; и для любых других применений композиций, содержащих полипептиды РН20.

Здесь предусмотрен способ идентификации и отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего стабильностью в денатурирующих условиях, который включает стадии: а) тестирования активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в композиции, содержащей денатурирующий агент, и/или в денатурирующих условиях; б) тестирования активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в той же самой композиции и/или в тех же самых условиях, как на стадии а), но в отсутствие денатурирующего агента или условия; и с) отбора или идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего активностью на стадии а), которая составляет, по меньшей мере, 5% от активности на стадии б). В таком примере активность представляет собой гиалуронидазную активность. В некоторых примерах способов модифицированный деградирующий гиалуронан фермент выбирают или идентифицируют, если активность на стадии а) составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или больше от активности на стадии б), например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент выбирают или идентифицируют, если активность на стадии а) составляет по меньшей мере 40% или больше от активности на стадии б). Способ также может включать стадии d) сравнения активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента на стадии а) с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, тестируемой в тех же самых условиях; и е) идентификации или отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего по меньшей мере 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000% или большей гиалуронидазной активностью по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом.

Также в настоящем документе предусмотрен способ идентификации и отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего стабильностью, например, повышенной стабильностью в денатурирующих условиях, который включает стадии: а) тестирования активности модифицированного

деградирующего гиалуронан фермента в композиции, содержащей денатурирующий агент, и/или в денатурирующих условиях; б) тестирования активности соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в композиции, содержащей тот же самый денатурирующий агент, и/или в тех же самых денатурирующих условиях, что и на стадии а), при этом активность тестируют в тех же самых условиях, что и на стадии а); и с) отбора и идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего большей активностью по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом, тем самым идентифицируют и выбирают модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, обладающий повышенной стабильностью в денатурирующих условиях. В таком примере активность может представлять собой гиалуронидазную активность. В примерах способа модифицированный деградирующий гиалуронан фермент выбирают или идентифицируют, если его активность составляет по меньшей мере 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170%, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000% или больше от активности не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента. В таком примере способ также может включать дополнительные

стадии: d) тестирования активности выбранного или идентифицированного модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в композиции, содержащей денатурирующий агент, и/или в денатурирующих условиях; e) тестирования активности того же самого выбранного или идентифицированного модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в той же самой композиции, и/или в тех же самых условиях, что и на стадии d), но в отсутствие денатурирующего агента или условия; и f) отбора или идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего активностью на стадии d), которая составляет по меньшей мере 5% от активности на стадии e). В таком примере активность представляет собой гиалуронидазную активность. В некоторых примерах способов модифицированный деградирующий гиалуронан фермент выбирают или идентифицируют, если активность на стадии d) составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или больше от активности на стадии e), например модифицированный деградирующий гиалуронан фермент выбирают или идентифицируют, если активность на стадии d) составляет по меньшей мере 40% или больше от активности на стадии e).

В любых способах, предусмотренных в настоящем документе для идентификации или отбора модифицированного деградирующего фермента, денатурирующий агент или условие представляют собой температуру, перемешивание, отсутствие или низкое содержание соли или присутствие эксципиента. Например, денатурирующий агент или условие представляют собой повышенную температуру в диапазоне или примерно в диапазоне от 30 до 42°C, например выше чем или примерно выше чем 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42°C. В других примерах денатурирующий агент или условие представляют собой отсутствие соли или низкое содержание соли меньше чем 100 мМ, например низкое содержание соли меньше чем 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 мМ. В других примерах денатурирующий агент или условие представляют собой денатурирующий эксципиент, выбранный из антиадгезионных агентов, связующих агентов, агентов для покрытия оболочкой, наполнителей и разбавителей, вкусоароматических агентов, красителей, смазывающих веществ, глидантов, консервантов, детергентов, сорбентов и подсластителей.

В конкретных примерах любых способов, предусмотренных в настоящем документе для идентификации или отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, денатурирующий агент или условие представляет собой консервант (консерванты), например фенольный консервант (консерванты). Фенольные консерванты могут представлять собой фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт или парабен. Например, денатурирующий агент или условие представляет собой консервант, такой как фенол и/или м-крезол. В таких примерах общее количество фенольного консерванта в композиции, выраженное в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем), составляет или составляет примерно от 0,05 до 0,6%, от 0,1 до 0,4%, от 0,1 до 0,3%, от 0,15 до 0,325%, от 0,15 до 0,25%, от 0,1 до 0,2%, от 0,2 до 0,3% или от 0,3 до 0,4% включительно.

В любых способах, предусмотренных в настоящем документе для идентификации или отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, перед тестированием активности композиции деградирующего гиалуронан фермента на стадии a) и/или b) деградирующий гиалуронан фермент подвергают воздействию денатурирующего условия или денатурирующего агента в течение заранее определенного времени. Заранее определенное время представляет собой период времени, который выбирают в зависимости от конкретного деградирующего гиалуронан фермента, конкретного денатурирующего условия или денатурирующего агента, количества или степени денатурирующего условия или денатурирующего агента, применения деградирующего гиалуронан фермента и других подобных факторов. Например, заранее определенное время может составлять или составлять примерно от 1 мин до 1 месяца, от 1 мин до 3 недель, от 1 мин до 2 недель, от 1 мин до 1 недели, от 1 мин до 24 ч, от 1 мин до 12 ч, от 30 мин до 6 ч или от 1 до 4 ч, например по меньшей мере или по меньшей мере примерно 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 ч, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, две недели или один месяц.

В любом из способов, предусмотренных в настоящем документе для идентификации и отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент представляет собой модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который содержит аминокислотную замену, вставку или делецию аминокислот по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом. Например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент содержит аминокислотную замену, например одну аминокислотную замену или две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или больше аминокислотных замен по сравнению с не модифицированной формой деградирующего гиалуронан фермента. В конкретных аспектах способа библиотеку или выборку модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов сканируют, чтобы получить, или идентифицировать, или выбрать модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, обладающий стабильностью, например повышенной стабильностью, в денатурирующих условиях. Таким образом, в примерах способов в настоящем документе множество модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов тестируют на стадии a) и/или b). В таких примерах множество модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов модифицированы по сравнению с соответствующим не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом с целью получения выборки модифицирован-

ных деградирующих гиалуронан ферментов, при этом каждый модифицированный белок в выборке тестируют в каждой из стадий а) и/или б). В выборке или библиотеке каждый модифицированный деградирующий гиалуронан фермент содержит только одну аминокислотную замену по сравнению с не модифицированной формой деградирующего гиалуронан фермента, таким образом, что множество модифицированных ферментов составлено таким образом, что аминокислота в каждой модифицированной позиции замещена на 1-19 других аминокислот, отличающихся от первоначальной аминокислоты в этой позиции, при этом каждый модифицированный деградирующий гиалуронан фермент содержит другую аминокислотную замену, и каждая аминокислота в последовательности деградирующего гиалуронан фермента или в ее выбранной части является замененной.

В любом из предусмотренных в настоящем документе способов модифицированный деградирующий гиалуронан фермент является модифицированным по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом посредством вставки, делеции или замены аминокислот (аминокислоты). Модифицированный деградирующий гиалуронан фермент может представлять собой хондроитиназу или может представлять собой гиалуронидазу. В примерах в настоящем документе не модифицированная гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу PH20 или ее укороченную форму без С-концевого сайта присоединения гликозилфосфатидилинозитольного якоря (GPI) или без части сайта присоединения GPI якоря, при этом укороченная форма обладает гиалуронидазной активностью. Гиалуронидаза PH20 может представлять собой PH20 человека, обезьяны, быка, овцы, крысы, лисы, мыши или морской свинки. В конкретных примерах гиалуронидаза PH20 представляет собой PH20 человека или ее укороченную с С-конца форму. Например, не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент представляет собой деградирующий гиалуронан фермент, который имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861, 870, например, обладает по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 24, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 или 870. В конкретных примерах не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент представляет собой гиалуронидазу PH20, имеющую последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, например последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ли большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72.

В любом из способов, предусмотренных в настоящем документе для идентификации или отбора модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, обладающего стабильностью, способ осуществляется *in vitro*. Также предусмотрены любые из способов, являющиеся итеративными, стадии которых повторяются множество раз, причем при каждом повторении из выбранного модифицированного деградирующего гиалуронан фермента получают и тестируют дополнительные модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты, при этом модифицированный деградирующий гиалуронан фермент изменяется для того, чтобы иметь повышенную стабильность в денатурирующих условиях. Также в настоящем документе предусмотрен модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, идентифицированный любым из предусмотренных в настоящем документе способов.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена последовательность аминокислот полноразмерного PH20 человека (приведена в SEQ ID NO: 7) и его растворимых укороченных с С-конца вариантов. С-концевые аминокислотные остатки приведенных в качестве примера укороченных с С-конца вариантов полноразмерного PH20 выделены жирным шрифтом. Полные аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера укороченных с С-конца вариантов полноразмерного PH20 также предусмотрены в SEQ ID NOS: 3 и 32-66. С-концевой аминокислотный остаток приведенного в качестве примера растворимого PH20, полная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 3, также обозначен подчеркиванием. Неограничивающие примеры позиций аминокислот для аминокислотных замен выделены серым цветом. Соответствующие позиции могут быть идентифицированы путем выравнивания нужной последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7 или 32-66 и, в частности, с SEQ ID NO: 3.

На фиг. 2 приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с другими полипептидами PH20. "*" означает, что выравниваемые остатки являются идентичными, ":" означает, что выравниваемые остатки не являются идентичными, но являются сходными и содержат консервативные аминокислотные остатки в выравниваемых позициях, и "." означает, что выравниваемые остатки являются сходными и содержат полуконсервативные аминокислотные остатки в выравниваемых позициях. Неограничивающие примеры соответствующих позиций аминокислот для аминокислотных замен выделены серым цветом. Например, на фиг. 2А приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 шимпанзе, приведенным в SEQ ID NO: 10. На фиг. 2В приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 макаки-резус, приведенным в SEQ ID NO: 12. На фиг. 2С приведен пример выравнивания

растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 яванского макака, приведенным в SEQ ID NO: 14. На фиг. 2D приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 быка, приведенным в SEQ ID NO: 16. На фиг. 2E приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 мыши, приведенным в SEQ ID NO: 20. На фиг. 2F приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 крысы, приведенным в SEQ ID NO: 22. На фиг. 2G приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 кролика, приведенным в SEQ ID NO: 24. На фиг. 2H приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 морской свинки, приведенным в SEQ ID NO: 29. На фиг. 2I приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 лисы, приведенным в SEQ ID NO: 31. На фиг. 2J приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 гиббона, приведенным в SEQ ID NO: 857. На фиг. 2K приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 игрушки, приведенным в SEQ ID NO: 859. На фиг. 2L приведен пример выравнивания растворимого PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 3, с PH20 орангутанга, приведенным в SEQ ID NO: 861.

Подробное описание

Содержание

- A. Определения.
- B. Гиалуронидаза PH20.
 - 1. Структура.
 - 2. Функция.
 - 3. Растворимые полипептиды PH20.
- C. Модифицированные полипептиды PH20.
 - 1. Активные мутанты.
 - a) Повышенная активность.
 - b) Повышенная стабильность.
 - i) Фенофильные полипептиды.
 - ii) Термофильные полипептиды.
 - iii) Отсутствие соли.
 - 2. Неактивные мутанты.
 - 3. Дополнительные модификации.
 - a) Пониженная иммуногенность.
 - b) Конъюгация с полимерами.
- D. Способы идентификации модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов с измененными свойствами и активностью.
 - 1. Деградирующие гиалуронан ферменты и библиотеки модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов.
 - 2. Скрининг или тестирование на желаемую активность или свойства.
 - 3. Отбор или идентификация.
 - 4. Итеративные способы.
- E. Получение модифицированных полипептидов и кодирующих молекул нуклеиновых кислот.
 - 1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды PH20.
 - 2. Создание мутантных или модифицированных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды.
 - 3. Векторы и клетки.
 - 4. Экспрессия.
 - a) Прокариотические клетки.
 - b) Дрожжевые клетки.
 - c) Насекомые и клетки насекомых.
 - d) Экспрессия в клутках млекопитающих.
 - e) Растения и растительные клетки.
 - 5. Очистка.
 - 6. Модификация полипептидов пегилированием.
- F. Фармацевтические композиции и лекарственные формы, дозирование и введение.
 - 1. Лекарственные формы в виде жидких лекарственных форм, инъеклируемых лекарственных форм и эмульсий.
 - a) Лиофилизированные препараты
 - b) Примеры лекарственных форм
 - i) NaCl.
 - ii) pH и буфер.
 - iii) Консерванты.
 - iv) Стабилизаторы.
 - 2. Композиции для других способов введения.

3. Дозирование и введение.
 4. Примеры совместных лекарственных форм РН20-инсулин.
 5. Упаковка, готовые изделия и наборы.
- Г. Способы оценки гиалуронидазной активности.
1. Гиалуронидазная активность.
 2. Растворимость.
 3. Чистота, кристаллизация или агрегация.
 4. Фармакодинамика/фармакокинетика.
- Н. Способы лечения и комбинированная терапия.
1. Способы доставки терапевтических агентов. Доставка инсулина.
 2. Способы лечения ассоциированных с гиалуронатом заболеваний и состояний.
 3. Другие применения.
 4. Контрацепция.
- И. Примеры.

А. Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится изобретение (изобретения). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, которые упоминаются во всем описании настоящего изобретения, если не указано иное, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В том случае, если существует множество определений для употребляемых здесь терминов, предпочтительными являются определения, указанные в этом разделе. Когда дается ссылка на URL или другой такой идентификатор или адрес, следует понимать, что такие идентификаторы могут измениться и конкретная информация в интернете может появляться и исчезать, но эквивалентная информация известна и ее можно легко найти путем поиска в интернете. Такая ссылка указывает на доступность и публичное распространение такой информации.

В настоящем документе деградирующий гиалуронат фермент относится к ферменту, который катализирует расщепление полимера гиалуронана (также называемого гиалуроновой кислотой или НА) на фрагменты с меньшей молекулярной массой. Примерами деградирующих гиалуронат ферментов являются гиалуронидазы и конкретно хондроитиназы и лиазы, которые обладают способностью к деполимеризации гиалуронана. Примеры хондроитиназ, которые являются деградирующими гиалуронат ферментами, включают, но не ограничиваются ими, хондроитин-АВС-лиазы (также известные как хондроитиназы АВС), хондроитин-АС-лиазы (также известные как хондроитинсульфатлиазы или хондроитинсульфатэлиминазы) и хондроитин-С-лиазы. Хондроитин-АВС-лиазы включают два фермента, хондроитинсульфат-АВС-эндолиазу (ЕС 4.2.2.20) и хондроитин-сульфат-АВС-экзолиазу (ЕС 4.2.2.21). Примеры хондроитин-сульфат-АВС-эндолиаз и хондроитин-сульфат-АВС-экзолиаз включают, но не ограничиваются ими, ферменты из *Proteus vulgaris* и *Pedobacter heparinum* (хондроитин-сульфат-АВС-эндолиаза *Proteus vulgaris* приведена в SEQ ID NO: 98; Sato et al. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(1):39-46). Примеры хондроитиназ-АС из бактерий включают, но не ограничиваются ими, фермент из *Pedobacter heparinum*, приведенный в SEQ ID NO: 923, из *Victivallis vadensis*, приведенный в SEQ ID NO: 924, и из *Arthrobacter aureus* (Tkalec et al. (2000) *Applied and Environmental Microbiology* 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30(5):387-444). Примеры хондроитиназ-С из бактерий включают, но не ограничиваются ими, ферменты из *Streptococcus* и *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) *FEMS-Microbiol-Lett.* 48(2):121-4; Michelacci et al. (1976) *J. Biol. Chem.* 251:1154-8; Tsuda et al. (1999) *Eur. J. Biochem.* 262:127-133).

В настоящем документе гиалуронидаза относится к классу ферментов, деградирующих гиалуронат. Гиалуронидазы включают бактериальные гиалуронидазы (ЕС 4.2.2.1 или ЕС 4.2.99.1), гиалуронидазы пиявок, других паразитов и ракообразных (ЕС 3.2.1.36) и гиалуронидазы млекопитающих (ЕС 3.2.1.35). Гиалуронидазы включают любую из гиалуронидаз не человеческого происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, гиалуронидазы мыши, собаки, кошки, зайца, птиц, быка, овцы, свиньи, лошади, рыб, лягушек, бактериальные гиалуронидазы, и любые гиалуронидазы из пиявок, других паразитов и ракообразных. Примеры человеческих гиалуронидаз включают HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 и РН20. Примеры гиалуронидаз включают любые гиалуронидазы, приведенные в SEQ ID NOS: 6, 7-31, 69, 70, 71, 72, 856-861, 869-921, их зрелые формы (у которых отсутствует сигнальная последовательность), или их аллельные или видовые варианты. Гиалуронидазы также включают их укороченные формы, которые проявляют гиалуронидазную активность, в том числе их укороченные с С-конца варианты, которые являются растворимыми.

В настоящем документе РН20 относится к типу гиалуронидаз, которые находятся в сперме и являются активными в нейтральной среде. РН20 находится на поверхности сперматозоидов и в происходящей из лизосомы акросоме, где она связана с внутренней мембраной акросомы. РН20 включает в себя РН20 любого происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, РН20 человека, шимпанзе, яванского макака, макака-резуса, мыши, коровы, овцы, морской свинки, кролика и крысы. Примеры белков РН20

включают, но не ограничиваются ими, полипептиды PH20 человека (SEQ ID NO: 6 и 7), шимпанзе (SEQ ID NO: 8, 9, 10, 869 и 870), макака-резус (SEQ ID NO: 11 и 12), яванского макака (SEQ ID NO: 13 и 14), коровы (SEQ ID NO: 15-18), мыши (SEQ ID NO: 19 и 20), крысы (SEQ ID NO: 21 и 22), кролика (SEQ ID NO: 23 и 24), овцы (SEQ ID NO: 25-27), морской свинки (SEQ ID NO: 28 и 29), лисы (SEQ ID NO: 30 и 31), гиббона (SEQ ID NO: 856 и 857), игрунки (SEQ ID NO: 858 и 859) и орангутана (SEQ ID NO: 860 и 861). Ссылка на PH20 включает полипептиды-предшественники PH20 и зрелые полипептиды PH20 (такие как полипептиды, в которых была удалена сигнальная последовательность), укороченные формы, которые обладают активностью, и включает аллельные варианты и видовые варианты, варианты, кодируемые вариантами сплайсинга, и другие варианты, в том числе полипептиды, которые имеют по меньшей мере 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или большую идентичность последовательности с полипептидом-предшественником, приведенным в SEQ ID NO: 7 или его зрелой формой. Полипептиды PH20 также включают полипептиды, которые содержат химические или посттрансляционные модификации, и полипептиды, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнезилирование, карбоксилирование, фосфорилирование, гидроксидирование и другие модификации полипептида, известные в данной области. Примерами коммерчески доступных бычьих или овечьих растворимых гиалуронидаз являются гиалуронидаза Vitrase® (овечья гиалуронидаза) и гиалуронидаза Amphadase® (бычья гиалуронидаза).

В настоящем документе растворимый PH20 относится к полипептиду, являющемуся растворимым при физиологических условиях. Обычно, растворимый PH20 не имеет всей или части последовательности присоединения гликофосфатидилинозитольного якоря (GPI), или не заякорен в мембране другим способом. Например, растворимый PH20 может представлять собой укороченный с С-конца вариант PH20 без непрерывной последовательности аминокислот, соответствующей всей или части последовательности присоединения гликофосфатидилинозитольного якоря (GPI). Таким образом, при экспрессии из клетки, растворимый PH20 секретируется в среду. Растворимые белки PH20 можно отличить, например, по их распределению в водную фазу раствора Triton X-114, нагретого до 37°C (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). Заякоренные в мембране, например, заякоренные липидами гиалуронидазы будут распределяться в фазу, богатую детергентом, но после обработки фосфолипазой-С будут распределяться в фазу, бедную детергентом, или в водную фазу. Растворимые гиалуронидазы PH20 включают заякоренные в мембране гиалуронидазы, у которых одна или несколько областей, ассоциированных с заякориванием гиалуронидазы в мембране, были удалены или модифицированы, и растворимые формы которых сохраняют гиалуронидазную активность. Растворимые гиалуронидазы включают рекомбинантные растворимые гиалуронидазы и растворимые гиалуронидазы, которые содержатся в природных источниках или выделены из природных источников, таких как, например, экстракты семенников овец или быков. Примером таких растворимых гиалуронидаз является растворимый PH20 человека (SEQ ID NO: 3 или 32-66). Другие растворимые гиалуронидазы включают PH20 овцы (SEQ ID NO: 25-27) и быка (SEQ ID NO: 16 или 18).

В настоящем документе растворимый PH20 человека (sHuPH20) включает полипептиды PH20 человека без непрерывной последовательности аминокислот С-конца PH20 человека, включающей всю последовательность гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря или ее часть (укороченные с С-конца полипептиды PH20), так что при экспрессии полипептиды являются растворимыми при физиологических условиях. Например, растворимые полипептиды PH20 человека представляют собой укороченные с С-конца полипептиды PH20 человека, приведенные в SEQ ID NO: 6 в виде их предшественника или в SEQ ID NO: 7 в виде их зрелой формы без сигнальной последовательности, или их аллельные варианты (например, приведены в любой из SEQ ID NOS: 68-72). Растворимость можно оценить любым подходящим способом, демонстрирующим растворимость в физиологических условиях. Примером такого способа является анализ с помощью Triton® X-114, в котором оценивается распределение в водную фазу, как это описано выше. Кроме того, растворимый полипептид PH20 человека при получении в клетках CHO, таких как клетки CHO-S, представляет собой полипептид, который экспрессируется и секретируется в культуральную среду. Растворимые полипептиды PH20 человека, тем не менее, не сводятся к тем, которые получают в CHO клетках, они также могут быть получены в любой клетке или могут быть получены любым способом, в том числе, рекомбинантной экспрессией и полипептидным синтезом. Указание на секрецию в клетках CHO входит является дефиниционной. Таким образом, если полипептид может быть экспрессирован или секретирован в клетках CHO и является растворимым в среде, т.е. распределяется в водную фазу при экстракции Triton® X-114, он представляет собой растворимый полипептид PH20, независимо от того, получен он таким образом или нет. Полипептиды-предшественники для полипептидов sHuPH20 могут включать сигнальную последовательность, например гетерологичную или не гетерологичную (т.е. нативную) сигнальную последовательность. Примером предшественников являются полипептиды, которые включают сигнальную последовательность, такую как нативная 35 аминокислотная сигнальная последовательность в аминокислотных позициях 1-35 (см., например, аминокислоты 1-35 из SEQ ID NO: 6).

В настоящем документе "нативный" или "дикого типа" по отношению в полипептиду PH20 относится к полипептиду PH20, кодируемому нативным или встречающемся в природе геном PH20, включая аллельные варианты, которые встречаются в организмах, в том числе в человеке и других животных, в природе. Ссылка на PH20 дикого типа без ссылки на вид охватывает PH20 дикого типа любых видов. Полипептиды PH20 дикого типа включают кодируемый полипептид-предшественник, его фрагменты и его процессированные формы, например зрелые формы без сигнального пептида, а также любые их пре- или посттрансляционно процессированные или модифицированные формы. Нативные полипептиды PH20 также включают полипептиды PH20, которые являются посттрансляционно модифицированными, включая, но не ограничиваясь ими, полипептиды PH20, которые модифицированы гликозилированием, карбоксилированием и/или гидроксильным модифицированием. Последовательности аминокислот человеческих PH20 дикого типа, взятых в качестве примера, приведены в SEQ ID NOS: 6 и 7, и аллельные варианты, в том числе их зрелые формы приведены в SEQ ID NOS: 68-72. Другие нативные PH20, продуцируемые животными, включая, но не ограничиваясь ими, нативные последовательности или последовательности дикого типа, приведены в любой из SEQ ID NOS: 8-31, 856-861, 869 или 870.

В настоящем документе модификация представляет собой модификацию последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот и нуклеотидов соответственно. Модификации также могут включать посттрансляционные модификации или другие изменения в молекуле, которые могут возникать в результате конъюгации или связывания, напрямую или не напрямую, с другим фрагментом. Способы модификации полипептида являются обычными для специалистов в данной области техники, например, таким способом является технология рекомбинантных ДНК.

В настоящем документе "модифицированный деградирующий гиалуронан фермент" относится к деградирующему гиалуронан ферменту, который содержит модификацию по сравнению с деградирующим гиалуронан ферментом сравнения или не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом. Модификация может представлять собой аминокислотную замену (замещение), вставку (добавление) или делецию одного или нескольких аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки могут представлять собой природные или не природные аминокислоты. В некоторых случаях модификация может представлять собой посттрансляционную модификацию. Модифицированный деградирующий гиалуронан фермент может иметь до 150 отличий в аминокислотах по сравнению с деградирующим гиалуронан ферментом сравнения или не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом при условии, что полученный модифицированный гиалуронан фермент обладает гиалуронидазной активностью. Как правило, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 модификаций аминокислот.

В настоящем документе не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент относится к первоначальному полипептиду, выбранному для модифицирования, как это предусмотрено в настоящем документе. Первоначальный полипептид может представлять собой полипептид дикого типа, встречающийся в природе. Кроме того, первоначальный полипептид может быть изменен или мутирован таким образом, что он отличается от нативной изоформы дикого типа, но, тем не менее, относится в настоящем документе к первоначальному не модифицированному полипептиду в сравнении с модифицированными полипептидами, полученными из него в результате последующих модификаций. Таким образом, существующие белки, известные специалистам в данной области, которые были модифицированы для получения желаемого повышения или понижения конкретной активности или свойства по сравнению с не модифицированным белком сравнения, могут быть выбраны и использоваться в качестве первоначального не модифицированного полипептида. Например, белок, который был модифицирован из нативной формы путем изменения одной или нескольких аминокислот, и имеющий либо повышение, либо понижение желаемого свойства, например, путем внесения изменений в один или несколько аминокислотных остатков для изменения гликозилирования, может быть выбран для модифицирования, и, таким образом, в отношении этих последующих модификаций будет считаться не модифицированным. Не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент включает человеческие или не человеческие деградирующие гиалуронан ферменты, в том числе деградирующие гиалуронан ферменты из млекопитающих, отличных от человека, и бактерий. Примером не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента является любой деградирующий гиалуронан фермент, приведенный в SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 7-66, 68-72, 856-861, 869-924, или их зрелые, укороченные с С-конца формы, которые обладают гиалуронидазной активностью, или деградирующий гиалуронан фермент, который обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 7-66, 68-72, 856-861, 869-924. Понятно, что не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент обычно представляет собой такой деградирующий гиалуронан фермент, который не содержит модификаций, таких как аминокислотные замены в модифицированном деградирующем гиалуронан ферменте.

В настоящем документе "модифицированный полипептид PH20" или "вариант полипептида PH20" относится к полипептиду PH20, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную модифика-

цию, например по меньшей мере одну аминокислотную замену, как это описано здесь, в своей аминокислотной последовательности по сравнению с не модифицированным полипептидом RH20 сравнения. Модифицированный полипептид RH20 может иметь до 150 аминокислотных замен, при условии, что полученный модифицированный полипептид RH20 обладает гиалуронидазной активностью. Как правило, модифицированный полипептид RH20 содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислотных замен. Понятно, что модифицированный полипептид RH20 также может включать любую одну или несколько других модификаций, в дополнение по меньшей мере к одной аминокислотной замене, как это описано в настоящем документе.

В настоящем документе не модифицированный полипептид RH20 относится к первоначальному полипептиду RH20, выбранному для модифицирования, как это предусмотрено здесь. Первоначальный полипептид может представлять собой полипептид дикого типа, встречающийся в природе. Кроме того, первоначальный полипептид может быть изменен или мутирован таким образом, что он отличается от нативной изоформы дикого типа, но, тем не менее, относится в настоящем документе к первоначальному не модифицированному полипептиду в сравнении с модифицированными полипептидами, полученными из него в результате последующих модификаций. Таким образом, существующие белки, известные специалистам в данной области, которые были модифицированы для получения желаемого повышения или понижения конкретной активности или свойства по сравнению с не модифицированным белком сравнения, могут быть выбраны и использоваться в качестве первоначального не модифицированного полипептида. Например, белок, который был модифицирован из нативной формы путем изменения одной или нескольких аминокислот, и имеющий либо повышение, либо понижение желаемого свойства, например, путем внесения изменений в один или несколько аминокислотных остатков для изменения гликозилирования, может быть выбран для модифицирования, и, таким образом, в отношении этих последующих модификаций будет считаться не модифицированным. Примером не модифицированных полипептидов RH20 являются полипептиды RH20 человека или их аллельные или видовые варианты, или другие варианты, в том числе зрелые полипептиды и полипептиды-предшественники. Например, примером полипептидов RH20 сравнения является зрелый полноразмерный полипептид RH20, приведенный в SEQ ID NOS: 7, 69 или 72, или его укороченные с С-конца формы, такие как приведенные в любой из SEQ ID NOS: 3 и 32-66, или полипептид RH20, который обладает по меньшей мере 68, 69, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. Полипептид RH20 сравнения также может включать соответствующие полипептиды предшественники, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 2, 6, 68, 70, 71, или другие полипептиды предшественники, или может представлять собой полипептид RH20, который обладает по меньшей мере 68, 69, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 2, 6, 68, 70, 71. Понятно, что не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент обычно представляет собой такой деградирующий гиалуронан фермент, который не содержит модификаций, таких как аминокислотные замены в модифицированном деградирующем гиалуронан ферменте.

В настоящем документе N-связанный фрагмент относится к аминокислотному остатку аспарагина (N) полипептида, который может быть гликозилирован в результате посттрансляционной модификации полипептида. Примеры N-связанных фрагментов RH20 человека включают аминокислоты N47, N131, N200, N219, N333, N358 и N365 в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7 (соответствующие аминокислотным остаткам N82, N166, N235, N254, N368, N393 и N490 RH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 6).

В настоящем документе N-гликозилированный полипептид относится к полипептиду RH20, содержащему олигосахариды, присоединенные по меньшей мере к трем N-связанным аминокислотным остаткам, например N-связанным фрагментам, соответствующим аминокислотным остаткам N200, N333 и N358 в SEQ ID NO: 3 или 7. N-гликозилированный полипептид может включать полипептид, в котором три, четыре, пять или все N-связанные фрагменты связаны с олигосахаридом. N-связанные олигосахариды могут включать олигоманнозу, комплексные, гибридные или сульфатированные олигосахариды или другие олигосахариды и моносахариды.

В настоящем документе частично N-гликозилированный полипептид относится к полипептиду, который содержит по меньшей мере N-ацетилглюкозаминогликан, присоединенный по меньшей мере к трем N-связанным фрагментам. Частично гликозилированный полипептид может включать различные формы гликанов, в том числе моносахариды, олигосахариды и разветвленные формы сахаров, в том числе гликаны, которые образуются в результате обработки полипептида EndoH, EndoF1, EndoF2 и/или EndoF3.

Использованный в настоящем документе термин "условия" относится к любому параметру, который может влиять на активность или свойства белка или агента. В рамках настоящего документа условия обычно относятся к присутствию, в том числе к количеству, эксципиентов, носителей или других компонентов, отличающихся от активного агента (например, модифицированной гиалуронидазы RH20), в лекарственной форме; температуре; времени (например, времени хранения или воздействия); емкости для

хранения; особенностям хранения (например, перемешивание) и/или другим условиям, связанным с воздействием или применением.

Использованные в настоящем документе в отношении белка термин "денатурация" или "денатурирующий" или другие их грамматические варианты относятся к таким биохимическим изменениям в белке, которые приводят к снижению или потере свойств или активности белка. Биохимические изменения могут представлять собой изменения третичной структуры белка, заключающиеся в разворачивании белка. Свойства или активность могут быть полностью потеряны или могут быть снижены на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более.

В настоящем документе свойство относится к физическим или структурным свойствам, таким как пространственная структура, рI, период полувыведения, конформация и другие такие физические характеристики. Например, изменения свойств могут проявляться как растворимость, агрегация или кристаллизация белка.

В настоящем документе активность относится к функциональной активности или активностям полипептида или его части, ассоциированной с полноразмерным (целым) белком. Функциональные активности включают, не ограничиваясь ими, биологическую активность, каталитическую или энзиматическую активность, антигенность (способность связываться или конкурировать с полипептидом за связывание с антителом против полипептида), иммуногенность, способность формировать мультимеры и способность специфично связываться с рецептором или лигандом полипептида.

В настоящем документе гиалуронидазная активность относится к способности ферментативно катализировать расщепление гиалуроновой кислоты. В анализе фармакопеи США (USP) XXII для гиалуронидазы гиалуронидазная активность определяется не непосредственно, а путем измерения количества субстрата, высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, или гиалуронана (НА), оставшегося после взаимодействия фермента с НА в течение 30 мин при 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Для определения относительной активности, в единицах, любой гиалуронидазы в анализе может использоваться стандартный раствор сравнения. In vitro анализы для определения гиалуронидазной активности гиалуронидаз, такой как PH20, известны специалистам в данной области техники и описаны в настоящем документе. Примеры анализов включают описанный в настоящем документе микроанализ мутности, в котором измеряют расщепление гиалуроновой кислоты гиалуронидазой не непосредственно, а путем обнаружения нерастворимого осадка, сформированного в результате связывания недеградированной гиалуроновой кислоты с сывороточным альбумином. Для определения активности тестируемой гиалуронидазы в единицах, например, для получения калибровочной кривой могут использоваться стандарты сравнения.

В настоящем документе активность в нейтральных условиях относится к способности полипептида PH20 ферментативно катализировать расщепление гиалуроновой кислоты при нейтральном pH, таком как pH в диапазоне между или примерно между pH 6,0 и 7,8.

В настоящем документе "повышенная активность" в отношении модифицированной гиалуронидазы PH20 означает, что при тестировании в тех же самых условиях модифицированная гиалуронидаза PH20 обладает большей гиалуронидазной активностью по сравнению с не модифицированной гиалуронидазой PH20, не содержащей аминокислотных замен. Например, модифицированная гиалуронидаза PH20 обладает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% или большей активностью по сравнению с не модифицированной гиалуронидазой PH20 или гиалуронидазой PH20 сравнения.

В настоящем документе "растворимость" в отношении белка относится к белку, гомогенному в водном растворе, так что белковые молекулы диффундируют и не осаждаются спонтанно. Таким образом, раствор растворимого белка представляет собой такой раствор, содержащий белок, в котором отсутствуют видимые или дискретные частицы, так что частицы не могут быть легко отфильтрованы. Обычно белок является растворимым, если в растворе нет видимых или дискретных частиц. Например, белок является растворимым, если его раствор не содержит или содержит небольшое количество частиц, которые могут быть удалены с помощью фильтра с размером пор 0,22 мкм.

Использованные в настоящем документе термины агрегация или кристаллизация по отношению к белку относятся к присутствию видимых или дискретных частиц в растворе, содержащем белок. Как правило, частицы имеют размер больше 10 мкм, например больше 15, 20, 25, 30, 40, 50 мкм или больше. Агрегация или кристаллизация могут быть следствием пониженной растворимости, повышенной денатурации белка или формирования ковалентных связей.

Использованный в настоящем документе термин "денатурирующие условия" или "условия денатурации" относятся к любому условию или агенту, которые при воздействии на белок вызывают или влияют на деградацию или денатурацию белка, обычно в результате потери или частичной потери третичной или вторичной структуры белка. Денатурирующие условия могут приводить к таким эффектам как потеря или снижение активности, потеря или снижение растворимости, агрегация и/или кристаллизация. Денатурирующее условие не обязательно должно быть таким, которое полностью разрушительно для белка, но, тем не менее, представляет собой такое условие, которое приводит к снижению активности белка с течением времени. Таким образом, условие является денатурирующим, если активность белка при этом

снижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или больше по сравнению с отсутствием воздействия этого условия. Денатурирующее условие может являться следствием внешнего стресса или физического условия (например, перемешивания, температуры, времени хранения, отсутствия стабилизатора) или может быть вызвано присутствием денатурирующего агента. Например, денатурирующее условие может представлять собой нагревание, кислоту или химический денатурант. Примеры денатурирующих условий включают присутствие сильной кислоты или основания, концентрированной неорганической соли, органического растворителя (например, спирта или хлороформа), мочевины, высокий или низкий pH (экстремальные значения pH), повышенную температуру (например, нагревание), присутствие эксципиентов, которые могут быть денатурирующими (например, фенольных консервантов или детергентов), и низкое содержание или, по существу, отсутствие стабилизирующего агента, который по иным причинам требуется для стабильности белка (например, NaCl), но не ограничиваются ими.

В настоящем документе "денатурирующий агент" или "денатурант" относится к любому веществу, молекуле или соединению, которое вызывает денатурацию. Например, денатурирующий агент может включать сильную кислоту или основание, концентрированную неорганическую соль, органический растворитель (например, спирт или хлороформ), консервант, детергент или другой эксципиент.

В настоящем документе "устойчивость в денатурирующих условиях" относится к любому меньшему снижению или потере свойств или активности белка, связанным с денатурацией. Например, денатурация приводит к увеличению кристаллизации или агрегации, понижению растворимости или снижению активности, или ассоциирована с ними. Таким образом, устойчивость к денатурации означает, что в денатурирующих условиях белок обладает пониженной агрегацией или кристаллизацией, повышенной растворимостью или повышенной или увеличенной активностью (например, гиалуронидазной активностью) по сравнению с белком сравнения (например, не модифицированным ферментом). Устойчивость в денатурирующих условиях необязательно должна быть абсолютной или постоянной, но может достигаться за счет более медленной денатурации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом в денатурирующих условиях, так что активность или свойства модифицированного деградирующего гиалуронан фермента сохраняются дольше. Например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, такой как модифицированная гиалуронидаза RH20, будет обладать устойчивостью в денатурирующих условиях, если будет обладать, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ..., 20, ..., 30, ..., 40, ..., 50, ..., 60, ..., 70, ..., 80, ..., 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% большей устойчивостью к денатурации в денатурирующих условиях или в присутствии денатурирующего агента по сравнению с не модифицированным полипептидом. В некоторых примерах модифицированный полипептид обладает 105, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500% или более повышенной устойчивостью к денатурации по сравнению с не модифицированным полипептидом.

В настоящем документе стабильность модифицированной гиалуронидазы RH20 означает, что она обладает устойчивостью к денатурации, вызванной денатурирующими условиями или денатурирующим агентом. Модифицированный полипептид RH20 обладает стабильностью, если он сохраняет некоторую активность в денатурирующих условиях или в присутствии денатурирующего агента, например, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или больше от первоначальной или исходной гиалуронидазной активности до воздействия денатурирующих условий. Обычно, модифицированная гиалуронидаза RH20 является стабильной, если она сохраняет по меньшей мере 50% или больше от гиалуронидазной активности в денатурирующих условиях по сравнению с отсутствием денатурирующих условий. Способы оценки гиалуронидазной активности известны специалистам в данной области техники и описаны в настоящем документе. Понятно, что стабильность фермента необязательно должна быть постоянной или продолжительной, но должна проявляться в течение периода времени, в течение которого активность желательна. Например, модифицированная гиалуронидаза RH20 является стабильной, если она обладает активностью в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 6, 12, 24 ч, одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, одной недели, одного месяца, шести месяцев или одного года при воздействии или в процессе воздействия одного или нескольких денатурирующих условий или агентов (например, присутствие денатурирующего эксципиента, такого как консервант). Например, модифицированная гиалуронидаза RH20 является стабильной, если она обладает активностью при воздействии или в процессе воздействия одного или нескольких денатурирующих условий или агентов (например, присутствие денатурирующего эксципиента, такого как консервант) в течение по меньшей мере 1 месяца при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно, или в течение по меньшей мере 3 дней при температуре или примерно при температуре от 30 до 42°C включительно.

Таким образом, "стабильная" или "стабильность" в отношении предусмотренной в настоящем документе лекарственной формы или совместной лекарственной формы относится к такой композиции, в которой модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, например модифицированная гиалуронидаза RH20, является стабильным при воздействии одного или нескольких денатурирующих условий или агентов в композиции (например, присутствие денатурирующего эксципиента, такого как консервант) в течение по меньшей мере 1 месяца при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно, или в течение по меньшей мере 3 дней при температуре или примерно при температуре

от 30 до 42°C включительно.

В настоящем документе "повышенная стабильность" в отношении модифицированной гиалуронидазы RH20 означает, что в тех же самых денатурирующих условиях (например, присутствие денатурирующего эксципиента, такого как консервант), модифицированная гиалуронидаза RH20 обладает большей гиалуронидазной активностью по сравнению с не модифицированной гиалуронидазой RH20, не содержащей аминокислотных замен. Например, модифицированная гиалуронидаза RH20 обладает повышенной стабильностью, если она обладает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% или большей активностью по сравнению с активностью гиалуронидазы RH20 сравнения или не модифицированной гиалуронидазы в денатурирующих условиях (например, присутствие денатурирующего эксципиента, такого как консервант).

В настоящем документе "повышенная температура" относится к температурам выше комнатной температуры или температуры окружающей среды. Обычно, повышенная температура представляет собой температуру, которая составляет по меньшей мере примерно 30°C или более, например от 30 до 42°C и обычно от 32 до 37°C или от 35 до 37°C включительно.

В настоящем документе комнатная температура относится к диапазону обычно от или примерно от 18 до или примерно до 32°C. Специалисту в данной области техники понятно, что комнатная температура зависит от местности и преобладающих условий. Например, комнатная температура может быть выше в более теплом климате, например в Италии или Техасе.

В настоящем документе фраза, что белки "сравнивают в одних и тех же (одинаковых) условиях" означает, что различные белки подвергаются идентичной или практически идентичной обработке, так что для тестируемых агентов любое одно или несколько условий, которые могут влиять на активность или свойства белка или агента, не изменяются или изменяются незначительно. Например, когда сравнивают гиалуронидазную активность модифицированного полипептида RH20 с гиалуронидазной активностью не модифицированного полипептида RH20, любое одно или несколько условий, таких как количество или концентрация полипептида; присутствие, в том числе количество, эксципиентов, носителей или других компонентов, отличающихся от активного агента (например, модифицированной гиалуронидазы RH20), в лекарственной форме; температура; время хранения; емкость для хранения; особенности хранения (например, перемешивание) и/или другие условия, связанные с воздействием или применением, являются идентичными или практически идентичными для сравниваемых полипептидов.

В настоящем документе "заранее определенное время" означает время, которое было установлено или выбрано предварительно. Например, заранее определенное время может представлять собой время, которое было выбрано предварительно, что связано с желаемой продолжительностью проявления активности деградирующего гиалуронан фермента в зависимости от желаемого применения белка. Заранее определенное время может составлять часы, дни, месяцы или годы. Например, заранее определенное время может составлять по меньшей мере примерно или примерно 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, шесть месяцев, один год или больше.

В настоящем документе "хранение" означает, что лекарственную форму не вводят субъекту немедленно после приготовления, но хранят в течение времени в конкретных условиях (например, конкретная температура; время и/или форма (например, жидкая или лиофилизованная форма)) перед применением. Например, жидкую лекарственную форму до введения субъекту можно хранить дни, недели, месяцы или годы при различных температурах, например при охлаждении (от 0 до 10°C, например, от 2 до 8°C), при комнатной температуре (например, температура до 32°C, например от 18 до или примерно до 32°C) или повышенной температуре (например, от 30 до 42°C, например от 32 до 37°C или от 35 до 37°C).

В настоящем документе "эксципиент" относится к соединению в лекарственной форме активного агента, которое не обеспечивает биологический эффект активного агента при введении в отсутствие активного агента. Примеры эксципиентов включают, но не ограничиваются ими, соли, буферы, стабилизаторы, модификаторы тоничности, металлы, полимеры, сурфактанты, консерванты, аминокислоты и сахара.

В настоящем документе стабилизирующий агент относится к соединению, добавляемому в лекарственную форму с целью защиты модифицированного полипептида RH20 или другого активного агента от деградации, при необходимости, например, вследствие воздействия на лекарственную форму денатурирующих условий при манипулировании препаратом, хранении или применении препарата. Таким образом, в понятие включены агенты, которые предотвращают деградацию белков в результате воздействия других компонентов в композициях. Примером таких агентов являются аминокислоты, производные аминокислот, амины, сахара, полиолы, соли и буферы, сурфактанты, ингибиторы или субстраты и другие агенты, описанные в настоящем документе.

В настоящем документе тест на противомикробную эффективность или тест на эффективность консерванта (PET) демонстрирует эффективность смеси консервантов в продукте. Продукт инокулируют контролируемым количеством определенных организмов. В тесте далее сравнивают уровень микроорганизмов, обнаруженных в контрольном образце, с уровнем микроорганизмов в тестируемом образце за

период времени 28 дней. Обычно, целевые рынки имеют различающиеся требования PЕТ. Например, требования PЕТ фармакопеи США (USP) и европейской фармакопеи (EP) различаются. Параметры для осуществления теста на противомикробную эффективность, в том числе для различных рынков, известны специалистам в данной области техники, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе эффективное против микроорганизмов количество консерванта относится к такому количеству консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов в образце, которые могли попасть туда при хранении или применении. Например, в случае упаковок лекарственных средств для многократного приема эффективное против микроорганизмов количество консерванта ингибирует рост микроорганизмов, которые могли попасть туда в результате многократного забора индивидуальных доз. В USP и EP (EPA и EPB) существуют противомикробные требования, определяющие эффективность консерванта и отличающиеся строгостью. Например, эффективное против микроорганизмов количество консерванта представляет собой такое количество, которое, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 10 раз через 7 дней после инокуляции в тесте на противомикробную эффективность консерванта (APET). В конкретном примере, эффективное против микроорганизмов количество консерванта представляет собой такое количество, которое, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 10 раз через 7 дней после инокуляции, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 1000 раз через 14 дней после инокуляции, по меньшей мере, обеспечивает отсутствие дальнейшего увеличения количества бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции и, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 7 дней после инокуляции. В следующем примере эффективное против микроорганизмов количество консерванта представляет собой такое количество, которое, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 10 раз через 24 ч после инокуляции, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 1000 раз через 7 дней после инокуляции, обеспечивает отсутствие дальнейшего увеличения количества бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции и, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества грибковых организмов в 10 раз через 14 дней после инокуляции и, по меньшей мере, обеспечивает отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 28 дней после инокуляции. В дополнительном примере, эффективное против микроорганизмов количество консерванта представляет собой такое количество, которое, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 100 раз через 6 ч после инокуляции, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества бактериальных организмов в 1000 раз через 24 ч после инокуляции, обеспечивает отсутствие восстановления количества бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции композиции микробным инокулятом, по меньшей мере, обеспечивает уменьшение количества грибковых организмов в 100 раз через 7 дней после инокуляции и, по меньшей мере, обеспечивает отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 28 дней после инокуляции.

В настоящем документе "консервант" относится к встречающемуся в природе или полученному синтетическим или рекомбинантным путем веществу, которое при добавлении к композиции молекулы или белка предотвращает рост микробов, в том числе рост бактерий или грибов, в композиции.

В настоящем документе "фенольный консервант" относится консерванту, который содержит одну гидроксильную группу, присоединенную к ароматическому углеродному кольцу, например к бензольному кольцу. Примеры фенольных консервантов включают, но не ограничиваются ими, фенол, м-крезол, п-гидроксибензойную кислоту, метилпарабен, этилпарабен и пропилпарабен. Например, крезол, в том числе, метакрезол (м-крезол), имеет метильную группу в качестве заместителя в бензольном кольце молекулы фенола.

В настоящем документе "фенофильный" относится к белку, такому как модифицированный полипептид РН20, который является стабильным в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта (консервантов). Термин "фенолфильный" может использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "фенофильный" и имеет такое же значение. Например, модифицированный полипептид РН20, являющийся фенофильным или фенолфильным, как правило, обладает повышенной стабильностью по сравнению с не модифицированной гиалуронидазой РН20, не содержащей аминокислотные замены, при тестировании в тех же самых денатурирующих условиях в присутствии фенольного консерванта (консервантов). Например, модифицированная гиалуронидаза РН20 обладает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% или большей активностью по сравнению с гиалуронидазой РН20 сравнения или не модифицированной гиалуронидазой РН20 в присутствии фенольного консерванта (консервантов).

В настоящем документе "термофильный" относится к белку, такому как модифицированный полипептид РН20, который является стабильным при повышенных температурах выше или примерно 30°C, например от 30 до 42°C, и обычно от 32 до 37°C или от 35 до 37°C. Например, модифицированный полипептид РН20, являющийся термофильным, как правило, обладает повышенной стабильностью по сравнению с не модифицированной гиалуронидазой РН20, не содержащей аминокислотные замены, при тес-

тировании в тех же самых денатурирующих условиях повышенной температуры. Например, модифицированная гиалуронидаза PH20 обладает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% или большей активностью по сравнению с гиалуронидазой PH20 сравнения или не модифицированной гиалуронидазой PH20 при повышенных температурах.

В настоящем документе термин "детергент" используется взаимозаменяемо с термином "сурфактант" или "поверхностно-активный агент". Сурфактанты, как правило, представляют собой органические соединения, являющиеся амфифильными, т.е. содержащими как гидрофобные группы ("хвосты"), так и гидрофильные группы ("головы"), что обеспечивает растворимость сурфактантов как в органических растворителях, так и в воде. Сурфактанты можно классифицировать по наличию формально заряженных групп в голове. Неионный сурфактант не имеет заряженных групп в голове, тогда как ионный сурфактант несет суммарный заряд в голове. Цвиттер-ионный сурфактант содержит две противоположно заряженные группы в голове. Некоторые примеры известных сурфактантов включают: анионные сурфактанты (на основе сульфат-аниона, сульфонат-аниона или карбоксилат-аниона): перфтороктаноат (PFOA или PFO), перфтороктансульфонат (PFOS), додецилсульфат натрия (SDS), лаурилсульфат аммония и другие соли алкилсульфатов, лауретсульфат натрия (также известный как этоксилированный лаурилсульфат натрия или SLES), алкилбензолсульфонат; катионные сурфактанты (на основе катионов четвертичного аммония): цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), также известный как гексадецилтриметиламмония бромид, и другие соли алкилтриметиламмония, цетилпиридиний хлорид (CPC), полиэтоксилированный талловый амин (POEA), бензалкония хлорид (BAC), бензетония хлорид (BZT); цвиттер-ионные сурфактанты (амфотерные): додецил бетаин; кокамидопропилбетаин; кокоамфоглицинат; неионные сурфактанты: алкилполи(этиленоксид), алкилфенолполи(этиленоксид), сополимеры поли(этиленоксида) и поли(пропиленоксида) (коммерчески известные как Полоксамеры или Полоксамины), алкилполиглюкозиды, в том числе октилглюкозид, децилмальтозид, жирные спирты (например, цетиловый спирт и олеиловый спирт), кокамид MEA, кокамид DEA, полисорбаты (Tween 20, Tween 80, и т.п.), детергенты Тритон (Triton) и оксид додецилдиметиламина.

В настоящем документе "буфер" относится к веществу, обычно раствору, которое может поддерживать постоянное значение pH при добавлении сильных кислот или сильных оснований и при внешнем влиянии температуры, давления, объема или окислительно-восстановительного потенциала. Буфер не допускает изменения концентрации другого химического вещества, например системы донора и акцептора протона, которые не допускают значительных изменений концентрации ионов водорода (pH). Значения pH всех буферов зависят от температуры и концентрации. Выбор буфера для поддержания значения или диапазона pH может быть осуществлен опытным путем специалистом в данной области техники на основании известной буферной емкости известных буферов. Примеры буферов включают, но не ограничиваются ими, бикарбонатный буфер, какодилатный буфер, фосфатный буфер или трис-буфер. Например, трис-буфер (триметамин) представляет собой буфер на основе амина, имеющий pKa 8,06 и эффективный диапазон pH между 7,9 и 9,2. Для буфера трис pH увеличивается примерно на 0,03 единицы с уменьшением температуры и уменьшается на 0,03-0,05 единиц при десятикратном разбавлении.

В настоящем документе остатки встречающихся в природе α -аминокислот представляют собой остатки тех обнаруживаемых в природе 20 α -аминокислот, которые включаются в белок в результате специфического распознавания нагруженной остатком аминокислоты молекулы тРНК соответствующим кодоном мРНК у человека.

В настоящем документе нуклеиновые кислоты включают ДНК, РНК и их аналоги, в том числе пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и их смеси. Нуклеиновые кислоты могут быть одно- или двухцепочечными. Что касается зондов или праймеров, необязательно меченных, например, обнаруживаемой меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка, то имеются в виду одноцепочечные молекулы. Такие молекулы, как правило, имеют такую длину, что их мишень является статистически уникальной или низкокопийной (как правило, меньше 5 копий, обычно меньше 3 копий) при исследовании библиотеки с помощью зондов и праймеров. Обычно зонд или праймер содержит по меньшей мере 14, 16 или 30 непрерывных нуклеотидов, последовательность которых комплементарна или идентична интересующему гену. Зонды и праймеры могут иметь в длину 10, 20, 30, 50, 100 или больше нуклеотидов.

В настоящем документе пептид относится к полипептиду, имеющему от 2 до 40 аминокислот в длину.

В настоящем документе аминокислоты, встречающиеся в различных предусмотренных в настоящем документе аминокислотных последовательностях, обозначены в соответствии с их известными трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурами (табл. 1). Нуклеотиды, встречающиеся в различных фрагментах нуклеиновых кислот, обозначены стандартными однобуквенными аббревиатурами, обычно используемыми в данной области техники.

В настоящем документе "аминокислота" представляет собой органическое соединение, которое содержит аминогруппу и карбоксильную группу. Полипептид содержит две или больше аминокислот. В рамках настоящего документа аминокислоты включают двадцать аминокислот, встречающихся в приро-

де, неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (т.е. аминокислоты, в которых α -углерод имеет боковую цепь).

В настоящем документе "аминокислотный остаток" относится к аминокислоте, образующейся в результате химического расщепления (гидролиза) полипептида по его пептидным связям. Предполагается, что аминокислотные остатки, описанные в настоящем документе, находятся в "L" изомерной форме. Остатки в "D" изомерной форме, специально обозначенные таким образом, могут замещать любой L-аминокислотный остаток, при условии, что желаемое функциональное свойство полипептида сохраняется. NH_2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида. В табл. 1 приведены аббревиатуры для аминокислотных остатков в соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968) и принятой 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822.

Таблица 1

Табл. соответствий

СИМВОЛ		АМИНОКИСЛОТА
1-буквенный	3-буквенный	
Y	Tyr	Тирозин
G	Gly	Глицин
F	Phe	Фенилаланин
M	Met	Метионин
A	Ala	Аланин
S	Ser	Серин
I	Ile	Изолейцин
L	Leu	Лейцин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутаминовая кислота
Z	Glx	Glu и/или Gln
СИМВОЛ		АМИНОКИСЛОТА
1-буквенный	3-буквенный	
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Asn и/или Asp
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестная или другая

Следует отметить, что все последовательности аминокислотных остатков, представленные в настоящем документе формулами, ориентированы слева направо традиционным образом в направлении от аминоконца к карбоксильному концу. Кроме того, фраза "аминокислотный остаток" имеет широкое определение и включает аминокислоты, перечисленные в таблице соответствия (табл. 1) и модифицированные и необычные аминокислоты, такие как указанные в 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822 и включенные в настоящий документ посредством ссылки. Более того, следует отметить, что черточка в начале или конце последовательности аминокислотных остатков указывает на пептидную связь с другой последовательностью одного или нескольких аминокислотных остатков, с аминоконцевой группой, такой как NH_2 , или с концевой карбоксильной группой, такой как COOH .

В настоящем документе "встречающиеся в природе аминокислоты" относятся к 20 L-аминокислотам, которые встречаются в полипептидах.

В настоящем документе "неприродная аминокислота" относится к органическому соединению, имеющему структуру, аналогичную природной аминокислоте, но которое было структурно модифицировано, чтобы имитировать структуру и реакционную способность природной аминокислоты. Не встречающиеся в природе аминокислоты, таким образом, включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличающиеся от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают D-стереоизомеры аминокислот, но не ограничиваются ими. Примеры неприродных аминокислот описаны в настоящем документе и известны специалистам в данной области техники.

В настоящем документе изокинетическая смесь представляет собой такую смесь, в которой моляр-

ные соотношения аминокислот скорректированы на основании их известных скоростей реакций (см., например, Ostresh et al., (1994) Biopolymers 34:1681).

В настоящем документе подходящие консервативные аминокислотные замены известны специалистам в данной области техники и могут быть осуществлены, в общем, без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалистам в данной области техники известно, что, в общем, единичные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида значительно не изменяют его биологическую активность (см., например, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224). Такие замены можно осуществить в соответствии с заменами, которые приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

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

Другие замены также допустимы и могут быть определены опытным путем или в соответствии с известными консервативными заменами.

В настоящем документе конструкция ДНК представляет собой одно- или двухцепочечную линейную или кольцевую молекулу ДНК, содержащую сегменты ДНК, комбинированные и расположенные таким образом, который не встречается в природе. Конструкции ДНК существуют как результат манипуляций человека и включают клоны и другие копии молекул, полученных в результате таких манипуляций.

В настоящем документе сегмент ДНК представляет собой часть более крупной молекулы ДНК, имеющую заданные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий заданный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такой как плазида или фрагмент плазмиды, которая при чтении в направлении от 5' к 3' кодирует последовательность аминокислот заданного полипептида.

В настоящем документе термин полинуклеотид означает одно- или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, считываемый в направлении от 5' к 3' концу. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированы *in vitro* или получены комбинацией природных и синтетических молекул. Длина молекул полинуклеотидов приводится в настоящем документе в нуклеотидах (сокращенно "нт") или в парах оснований (сокращенно "по"). Термин нуклеотид используется для одно- или двухцепочечных молекул, где допускается контекстом. Когда термин применяется для двухцепочечных молекул, он используется для обозначения общей длины и эквивалентен термину пара оснований. Специалистам в данной области техники будет понятно, что две цепи двухцепочечного полинуклеотида могут немного различаться по длине, и что их концы могут образовывать уступ; так что не все нуклеотиды в двухцепочечной молекуле полинуклеотида могут быть спаренными. Такие неспаренные концы не будут, обычно, превышать 20 нуклеотидов в длину.

В настоящем документе фраза "в позиции, соответствующей" или указание, что позиция нуклеотидов или аминокислот "соответствует" позициям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, такой как последовательность, приведенная в Перечне последовательностей, относится к позициям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным с помощью выравнивания с раскрытой

последовательностью для максимизации идентичности с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. В рамках настоящего документа выравнивание последовательности PH20 осуществляют с аминокислотной последовательностью, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7 или 32-66 и, в частности, SEQ ID NO: 3. Таким образом, в настоящем документе указание, что позиция или аминокислотная замена соответствует позиции со ссылкой на SEQ ID NO: 3, также означает, что позиция или аминокислотная замена соответствует позициям со ссылкой на любую из SEQ ID NOS: 7 или 32-66, поскольку данные последовательности идентичны соответствующим остаткам, приведенным в SEQ ID NO: 3. Путем выравнивания последовательностей специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные или идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. В общем, для идентификации соответствующих позиций, последовательности аминокислот выравнивают таким образом, что достигается максимальное совпадение (см., например, *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; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). На фиг. 2 приведены примеры выравниваний и идентификации соответствующих позиций для замен.

В настоящем документе "идентичность последовательности" относится к числу идентичных или аналогичных аминокислот или пар нуклеотидов между тестируемым полипептидом или полинуклеотидом и полипептидом или полинуклеотидом сравнения. Идентичность последовательности можно определить путем выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот или белков для идентификации сходных или идентичных областей. В рамках настоящего документа идентичность последовательности обычно определяют путем выравнивания для идентификации идентичных остатков. Выравнивание может быть локальным или глобальным, но в рамках настоящего документа выравнивание обычно представляет собой глобальное выравнивание, когда сравниваются полноразмерные последовательности. Для сравниваемых последовательностей можно идентифицировать совпадения, несовпадения и разрывы. Разрывы представляют собой отсутствующие аминокислоты или нуклеотиды, вставляемые между остатками выравниваемых последовательностей, чтобы идентичные или сходные символы были выровнены. Обычно разрывы могут быть внутренними или концевыми. Идентичность последовательности можно определить, учитывая разрывы, как число идентичных остатков/длина наиболее короткой последовательности $\times 100$. При использовании штрафов за разрывы идентичность последовательности можно определить, не учитывая штрафы за концевые разрывы (например, штрафы за концевые разрывы не присваиваются). Альтернативно, идентичность последовательности можно определить, не учитывая разрывы, как число идентичных позиций/общая длина выравниваемой последовательности $\times 100$.

В настоящем документе "глобальное выравнивание" представляет собой выравнивание двух последовательностей от начала до конца, при этом каждая буква в каждой последовательности выравнивается только один раз. Выравнивание осуществляется, несмотря на то, есть или нет сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичности последовательности на основании "глобального выравнивания" означает, что при выравнивании полных последовательностей двух сравниваемых последовательностей, каждая длиной 100 нуклеотидов, 50% остатков являются одинаковыми. Понятно, что глобальное выравнивание также можно применять для определения идентичности последовательности, даже когда длины выравниваемых последовательностей не одинаковые. Различия в терминальных концах последовательностей будут учтены при определении идентичности последовательности, если "присваиваются штрафы за концевые разрывы". В основном глобальное выравнивание используется для последовательностей, которые имеют значительное сходство почти по всей длине их последовательностей. Примеры алгоритмов для проведения глобального выравнивания включают алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman-Wunsch) (Needleman et al. *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)). Примеры программ для проведения глобального выравнивания находятся в свободном доступе и включают Global Sequence Alignment Tool, доступный на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), и программу, доступную на сайте deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

В настоящем документе "локальное выравнивание" представляет собой выравнивание двух последовательностей, но только тех частей последовательностей, которые имеют сходство или идентичность. Таким образом, локальное выравнивание определяет, присутствует ли субсегмент одной последовательности в другой последовательности. Если сходства нет, выравнивание произведено не будет. Алгоритмы локального выравнивания включают BLAST или алгоритм Смита-Ватермана (Smith-Waterman) (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). Например, 50% идентичности последовательности на основании «локального выравнивания» означает, что при выравнивании полных последовательностей двух сравниваемых последовательностей любой длины область сходства или идентичности, имеющая 100 нуклеотидов в длину, имеет 50% одинаковых остатков в области сходства или идентичности.

В рамках настоящего документа идентичность последовательности можно определить с помощью

стандартных программ алгоритмов выравнивания с установленными по умолчанию штрафами за разрыв, предусмотренными разработчиками. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) унарную матрицу сравнения (содержащую величину 1 для идентичных элементов и 0 для не идентичных элементов) и взвешенную матрицу сравнения Gribskov et al. Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986), как описано Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) штраф 3,0 за каждый разрыв и дополнительный штраф 0,10 за каждый символ в каждом разрыве; и (3) отсутствие штрафа за концевые разрывы. Имеют ли любые две молекулы нуклеиновой кислоты последовательности нуклеотидов (или имеют ли любые два полипептида аминокислотные последовательности), которые "идентичны" по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% или другой аналогичный вариант процента идентичности, можно определить, используя известные компьютерные алгоритмы на основе локального или глобального выравнивания (см., например, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, где даны ссылки на десятки известных и находящихся в свободном доступе баз данных и программ для выравнивания). В основном, в рамках настоящего документа идентичность последовательности определяют с использованием компьютерных алгоритмов на основе глобального выравнивания, таких как программа глобального выравнивания по алгоритму Нидлмана-Вунша (Needleman-Wunsch Global Sequence Alignment tool), доступная на сайте NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (William Pearson, реализует алгоритм Huang и Miller (Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)); и программа Xiaohui Huang, доступная на сайте deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. В основном, в настоящем документе при сравнении последовательностей нуклеотидов используется выравнивание с учетом штрафов за концевые разрывы. Локальное выравнивание также можно использовать, когда сравниваемые последовательности имеют практически одинаковую длину.

Таким образом, использованный в настоящем документе термин "идентичность" относится к сравнению или выравниванию полипептида или полинуклеотида сравнения и тестируемого полипептида или полинуклеотида. В одном примере, не имеющем ограничительного характера, "по меньшей мере на 90% идентичны" относится к проценту идентичности от 90 до 100% по отношению к полипептиду или полинуклеотиду сравнения. Принимая для иллюстративных целей длину тестируемого полипептида или полинуклеотида и полипептида или полинуклеотида сравнения за 100 аминокислот или нуклеотидов, идентичность на уровне 90% или больше свидетельствует о том, что не более 10% (т.е. 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличаются от аминокислот или нуклеотидов в полипептиде или полинуклеотиде сравнения. Такие различия могут быть представлены как точечные мутации, случайным образом распределенные по всей длине аминокислотной последовательности, или могут быть кластеризованы в одной или нескольких локализациях различной длины, вплоть до максимально допустимой, например, 10/100 аминокислотных различий (приблизительно 90% идентичности). Различия также могут быть результатом делеции или укорочения последовательности аминокислотных остатков. Различия определяются как замены, вставки или делеции нуклеотидов или аминокислот. В зависимости от длины сравниваемых последовательностей при уровне гомологии или идентичности примерно выше 85-90% результат можно считать независимым от программы и набора параметров для разрывов; такие высокие уровни идентичности можно оценить легко, часто без использования программного обеспечения.

В настоящем документе аллельный вариант или аллельная вариация относится к любой из двух или большего числа альтернативных форм гена, располагающихся в одном и том же хромосомном локусе. В природе аллельные варианты возникают в результате мутации и могут приводить к фенотипическому полиморфизму в популяциях. Генная мутация может быть молчащей (отсутствуют изменения в кодируемом полипептиде) или может кодировать полипептиды, имеющие измененную аминокислотную последовательность. Термин "аллельный вариант" также используется в настоящем документе для обозначения белка, кодируемого аллельным вариантом гена. Как правило, форма гена, используемая для сравнения, кодирует форму дикого типа и/или преобладающую форму полипептида в популяции, или форму у одного представителя вида, взятого для сравнения. Как правило, аллельные варианты, которые включают варианты между видами и в пределах видов, имеют по меньшей мере 80, 90% или большую идентичность аминокислот с формой дикого типа и/или преобладающей формой для того же вида; степень идентичности зависит от гена и от того, является ли сравнение межвидовым или внутривидовым. Обычно, внутривидовые аллельные варианты имеют по меньшей мере примерно 80, 85, 90 или 95% идентичность или большую идентичность с формой дикого типа и/или преобладающей формой, в том числе 96, 97, 98, 99% или большую идентичность с формой дикого типа и/или преобладающей формой полипептида. В настоящем документе указание аллельного варианта, в основном, относится к вариантам белков у представителей одного и того же вида.

В настоящем документе "аллель", который используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "аллельный вариант", относится к альтернативным формам генов или их частей. Аллели занимают один и тот же локус или одну и ту же позицию в гомологичных хромосомах. Когда субъект имеет два идентичных аллеля гена, такого субъекта называют гомозиготным по данному гену или аллелю. Когда субъект имеет два различных аллеля гена, такого субъекта называют гетерозиготным по данному

гену. Аллели конкретного гена могут отличаться друг от друга одним нуклеотидом или несколькими нуклеотидами и могут включать модификации, такие как замены, делеции и вставки нуклеотидов. Аллель гена также может представлять собой форму гена, содержащего мутацию.

В настоящем документе видовые варианты относятся к вариантам полипептидов у разных видов, в том числе у разных видов млекопитающих, таких как мышь и человек. Примерами предусмотренных в настоящем документе видовых вариантов являются РН20 приматов, такие как РН20 человека, шимпанзе, макаки, яванского макака, гиббона, орангутанга или игрунки, но не ограничиваясь ими. Обычно, видовые варианты имеют 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 98% идентичность последовательностей. Соответствующие остатки для видовых вариантов можно определить путем сравнения и выравнивания последовательностей с максимизацией числа совпадений нуклеотидов или остатков, например, таким образом, что идентичность между последовательностями составляет или составляет более 95%, составляет или составляет более 96%, составляет или составляет более 97%, составляет или составляет более 98% или составляет или составляет более 99%. Интересующей позиции далее дается номер, присвоенный позиции в молекуле нуклеиновой кислоты сравнения. Выравнивание можно осуществить вручную или на глаз, в особенности, если идентичность последовательности составляет более 80%.

В настоящем документе "по существу, чистый" означает, по существу, гомогенный препарат, который не содержит легко обнаруживаемых примесей при определении стандартными способами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемыми специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, или препарат является, по существу, чистым, если дальнейшая очистка заметно не изменяет физические и химические свойства вещества, такие как энзиматическая и биологическая активность. Способы очистки соединений для получения, по существу, химически чистых соединений известны специалистам в данной области техники. По существу, химически чистое соединение, тем не менее, может представлять собой смесь стереоизомеров или изомеров. В таких примерах дальнейшая очистка может повысить удельную активность соединения.

В настоящем документе выделенный или очищенный полипептид или белок или их биологически активная часть, по существу, не содержат клеточного материала или других загрязняющих белков из клеток или тканей, из которых получен белок, или, по существу, не содержат химических веществ-предшественников или других химических веществ, если были получены химическим синтезом. Препараты могут считаться, по существу, чистыми, если они не содержат легко обнаруживаемых примесей при определении стандартными способами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемыми специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, или могут считаться, по существу, чистыми, если дальнейшая очистка заметно не изменяет физические и химические свойства вещества, такие как энзиматическая и биологическая активность. Способы очистки соединений для получения, по существу, химически чистых соединений известны специалистам в данной области техники. По существу, химически чистое соединение, тем не менее, может представлять собой смесь стереоизомеров. В таких примерах дальнейшая очистка может повысить удельную активность соединения.

Таким образом, ссылка на, по существу, очищенный полипептид, например, по существу, очищенный полипептид РН20, относится к препаратам белков РН20, которые, по существу, не содержат клеточного материала, и включает препараты белков, в которых белки отделены от компонентов клеток, из которых они были выделены или получены рекомбинантным путем. В одном из вариантов воплощения термин "по существу, не содержит клеточного материала" включает препараты белков-ферментов, которые содержат менее чем примерно 30% (сухой массы) белков, не являющихся ферментом (также называемых в настоящем документе загрязняющими белками), обычно менее чем примерно 20% белков, не являющихся ферментом, или менее чем примерно 10% белков, не являющихся ферментом, или менее чем примерно 5% белков, не являющихся ферментом. Если белок-фермент получен рекомбинантным путем, он также не содержит культуральную среду, т.е. культуральная среда составляет меньше чем примерно или меньше чем 20, 10 или 5% от объема препарата белка-фермента.

В настоящем документе термин "по существу, не содержит химических веществ-предшественников или других химических веществ" включает препараты белков-ферментов, в которых белок отделен от химических веществ-предшественников или других химических веществ, используемых в синтезе белка. Термин включает препараты белков-ферментов, которые содержат меньше чем примерно 30% (сухой массы), 20, 10, 5% или меньше химических веществ-предшественников или неферментативных химических веществ или компонентов.

В настоящем документе синтетический по отношению, например, к синтетической молекуле нуклеиновой кислоты или синтетическому гену или синтетическому пептиду означает молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу полипептида, полученную рекомбинантными способами и/или способами химического синтеза.

В настоящем документе получение рекомбинантным путем или с использованием методов рекомбинантных ДНК означает применение хорошо известных молекулярно-биологических способов для экспрессии белков, кодируемых клонируемой ДНК.

В настоящем документе вектор (или плаزمид) относится к дискретным элементам, используемым для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетки, либо для их экспрессии, либо для репликации. Векторы, как правило, являются эписомальными, но могут быть сконструированы таким образом, чтобы осуществлять интеграцию гена или его части в хромосому генома. Также предусмотрены векторы, являющиеся искусственными хромосомами, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и применение таких переносчиков хорошо известно специалистам в данной области техники.

В настоящем документе вектор экспрессии включает векторы, способные экспрессировать ДНК, функционально связанную с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, способными влиять на экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать последовательности промотора и терминатора, и необязательно могут включать одну или несколько точек начала репликации, один или несколько маркеров селекции, энхансер, сигнал полиаденилирования и тому подобное. Векторы экспрессии обычно получают из плазмид или вирусной ДНК, или они могут содержать элементы и тех, и других. Таким образом, вектор экспрессии относится к конструкции рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плазмид, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяина вызывает экспрессию клонируемой ДНК. Соответствующие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области техники и включают векторы, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, и векторы, которые являются эписомальными или векторы, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

В настоящем документе вектор также включает "векторы на основе вирусов" или "вирусные векторы". Вирусные векторы представляют собой сконструированные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве переносчиков или челноков) экзогенных генов в клетки. Вирусные векторы включают аденовирусные векторы, ретровирусные векторы и векторы на основе вируса осповакцины, но не ограничиваются ими.

В настоящем документе термины "функционально" или "функционально связанный" в отношении сегментов ДНК означают, что сегменты расположены таким образом, что они функционируют совместно в соответствии с их предполагаемыми назначениями, например транскрипция инициируется после промотора и перед транскрибируемой последовательностью. Промотор обычно представляет собой домен, с которым связывается транскрипционный аппарат для инициации транскрипции и ее продолжения через кодирующий сегмент до терминатора.

В настоящем документе конъюгат относится к модифицированному полипептиду РН20, связанному напрямую или не напрямую с одним или несколькими другими полипептидами или химическими фрагментами. Такие конъюгаты включают белки слияния, полученные химической конъюгацией и полученные любым другим способом, при этом, по меньшей мере, один модифицированный полипептид РН20 связан напрямую или не напрямую с другим полипептидом или химическим фрагментом, при условии, что такой конъюгат сохраняет гиалуронидазную активность. Примеры предусмотренных в настоящем документе конъюгатов включают полипептиды РН20, связанные напрямую или не напрямую с доменом мультимеризации (например, фрагментом Fc), токсином или лекарством.

В настоящем документе белок слияния относится к полипептиду, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность из одной молекулы нуклеиновой кислоты и кодирующую последовательность из другой молекулы нуклеиновой кислоты, в которой кодирующие последовательности находятся в одной рамке считывания, так что когда конструкция слияния транскрибируется и транслируется в клетке-хозяине, получается белок, содержащий два белка. Две молекулы могут примыкать друг к другу в конструкции или могут быть разделены линкерным полипептидом, содержащим 1, 2, 3 или более, но, как правило, менее 10, 9, 8, 7 или 6 аминокислот. Белковый продукт, кодируемый конструкцией слияния, называется полипептидом слияния. Примеры полипептидов слияния включают полипептиды слияния с Fc.

В настоящем документе полимер, конъюгированный с модифицированным полипептидом РН20, относится к любому полимеру, который ковалентно или иным образом стабильно связан, напрямую или через линкер, с модифицированным полипептидом РН20. Такие полимеры, как правило, увеличивают период полувыведения в сыворотке и включают сиаловые фрагменты, полиэтиленгликолевые (PEG) фрагменты, декстран и сахаридные и другие фрагменты, такие как присоединяемые при гликозилировании, но не ограничиваются ими.

В настоящем документе термины оценка или определение предназначены для получения количественного и качественного определения в смысле получения абсолютного значения для активности продукта, и также получения индекса, соотношения, процента, визуального или другого значения, свидетельствующего об уровне активности. Оценка может быть прямой или не прямой.

В настоящем документе "композиция" относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, она может быть водной, не водной или любой их комбинацией.

В настоящем документе лекарственная форма относится к композиции, содержащей по меньшей

мере один активный фармацевтический или терапевтический агент и один или несколько эксципиентов.

В настоящем документе совместная лекарственная форма относится к композиции, содержащей два или несколько активных или фармацевтических или терапевтических агента и один или несколько эксципиентов. Например, совместная лекарственная форма быстродействующего инсулина и деградирующего гиалуронан фермента содержит быстродействующий инсулин, деградирующий гиалуронан фермент и один или несколько эксципиентов.

В настоящем документе "комбинация" относится к любой ассоциации двух или более элементов. Неограничивающие примеры комбинаций включают две или несколько фармацевтических композиций, композицию, содержащую два или несколько активных ингредиента, таких как два модифицированных полипептида РН20; модифицированный полипептид РН20 и противораковый агент, такой как химиотерапевтическое соединение; модифицированный полипептид РН20 и терапевтический агент (например, инсулин); модифицированный полипептид РН20 и множество терапевтических и/или визуализирующих агентов, или любую их ассоциацию. Такие комбинации могут быть упакованы в виде наборов.

В настоящем документе набор представляет собой упакованную комбинацию, необязательно включающую инструкции по применению комбинации, и/или другие реактивы и компоненты для такого применения.

В настоящем документе "заболевание или расстройство" относится к патологическому состоянию в организме, развившемуся по причине или в результате состояния, такого как, например, инфекция, приобретенное состояние, генетическое состояние, но не ограничиваясь ими, и характеризующемуся идентифицируемыми симптомами.

В настоящем документе ассоциированное с гиалуронаном заболевание, расстройство или состояние относится к любому заболеванию или состоянию, при котором уровни гиалуронана повышены как причина заболевания или состояния, как следствие заболевания или состояния, или при котором повышенный уровень гиалуронана иным образом ассоциирован с заболеванием или состоянием. Ассоциированные с гиалуронаном заболевания и состояния ассоциированы с повышенной экспрессией гиалуронана в ткани или клетке, повышенным давлением интерстициальной жидкости (IFP), пониженным сосудистым объемом и/или повышенным содержанием воды в ткани. Ассоциированные с гиалуронаном заболевания, расстройства или состояния можно лечить введением композиции, содержащей деградирующий гиалуронан фермент, такой как гиалуронидаза, например растворимая гиалуронидаза, или самостоятельно, или в комбинации с другим лечением и/или агентом, или в дополнение к другому лечению и/или агенту. Примеры заболеваний и состояний включают, но не ограничиваются ими, богатые гиалуронаном раки, например опухоли, в том числе солидные опухоли, такие как рак на поздней стадии, метастатический рак, недифференцированный рак, рак яичников, карцинома *in situ* (ISC), плоскоклеточная карцинома (SCC), рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак толстой кишки и другие виды рака. Примерами ассоциированных с гиалуронаном заболеваний и состояний также являются заболевания, ассоциированные с повышенным давлением интерстициальной жидкости, например, заболевания, ассоциированные с внутридисковым давлением, и отеки, например, отеки, вызванные трансплантацией органа, ударом, травмой головного мозга или другим повреждением. Примеры ассоциированных с гиалуронаном заболеваний и состояний также включают заболевания и состояния, ассоциированные с повышенным давлением интерстициальной жидкости, пониженным сосудистым объемом и/или повышенным содержанием воды в ткани, в том числе рак, внутридисковое давление и отеки. В одном из примеров лечение ассоциированного с гиалуронаном состояния, заболевания или расстройства включает улучшение, снижение или другое благоприятное воздействие на один или несколько из следующих показателей: повышенное давления интерстициальной жидкости (IFP), пониженный сосудистый объем и повышенное содержание воды в ткани.

В настоящем документе "лечение" субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы у субъекта частично или полностью облегчаются или остаются неизменными после лечения. Таким образом, лечение включает профилактику, лечение и/или излечение. Профилактика относится к предотвращению возможного заболевания и/или предотвращению усугубления симптомов или прогрессирования заболевания. Лечение также включает любое фармацевтическое применение модифицированного интерферона и предусмотренных в настоящем документе композиций.

В настоящем документе фармацевтически эффективный агент или терапевтический агент включает любой биологически активный агент, который может оказывать терапевтический эффект для лечения заболевания или расстройства. Примеры терапевтических агентов описаны в настоящем документе. Терапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, обезболивающие агенты, сосудосуживающие агенты, диспергирующие агенты, традиционные терапевтические лекарства, в том числе низкомолекулярные лекарства, включая, но не ограничиваясь ими, бисфосфонаты, и терапевтические белки, включая, но не ограничиваясь ими, инсулин, молекулы IgG, антитела, цитокины и факторы коагуляции.

В настоящем документе "инсулин" относится к гормону, его предшественнику или синтетическому или рекомбинантному аналогу, который действует, вызывая увеличение поглощения и депонирования глюкозы и/или уменьшение эндогенной продукции глюкозы. Инсулин и его аналоги хорошо известны специалистам в данной области техники, включая человеческий инсулин и его аллельные и видовые ва-

рианты. Инсулин транслируется в виде полипептида-предшественника, называемого препроинсулином (110 аминокислот в случае инсулина человека), содержащего сигнальный пептид, который направляет белок в эндоплазматический ретикулум (ER), где сигнальная последовательность отщепляется, что приводит к образованию проинсулина. Проинсулин процессируется далее удалением С-пептида или соединительного пептида (31 аминокислотная С-цепь в случае инсулина человека). Полученный инсулин содержит А-цепь (21 аминокислот в длину в случае инсулина человека; приведена в SEQ ID NO: 862) и В-цепь (30 аминокислот в длину в случае инсулина человека; приведена в SEQ ID NO: 863), поперечно соединенные дисульфидными связями. Полностью поперечно соединенный инсулин человека содержит три дисульфидные связи: одну между позицией 7 в А-цепи и позицией 7 в В-цепи, вторую между позицией 20 в А-цепи и позицией 19 в В-цепи и третью между позициями 6 и 11 в А-цепи. Ссылка на инсулин включает мономерные и мультимерные инсулины, в том числе гексамерные инсулины, а также гуманизированные инсулины. Примерами полипептидов инсулина являются полипептиды инсулина млекопитающих, в том числе человека. Ссылка на инсулин включает препроинсулин, проинсулин и полипептиды инсулина в одноцепочечной или двухцепочечной формах, их укороченные формы, обладающие активностью, и включает аллельные варианты и видовые варианты инсулина человека, варианты, кодируемые вариантами сплайсинга, и другие варианты, такие как аналоги инсулина. Примером инсулина является инсулин человека, имеющий последовательности аминокислот А-цепи и В-цепи инсулина человека, приведенные в SEQ ID NOS: 862 и 863 соответственно, и его варианты или аналоги, которые обладают по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с одной из А-цепи или В-цепи, или обеими цепями, и которые вызывают увеличение поглощения и депонирования глюкозы и/или уменьшение продукции эндогенной глюкозы. Другим примером инсулина является свиной инсулин, имеющий последовательность аминокислот препроинсулина, приведенную в SEQ ID NO: 864, при этом А-цепь соответствует позициям аминокислотных остатков 88-108, и В-цепь соответствует позициям аминокислотных остатков 25-54, его варианты или аналоги, которые обладают по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с одной из А-цепи или В-цепи или обеими цепями, и который вызывает увеличение поглощения и депонирования глюкозы и/или уменьшение продукции эндогенной глюкозы.

В настоящем документе "быстродействующий инсулин" относится к любому инсулину, пиковый уровень которого наблюдается не больше чем через четыре часа или не больше чем примерно через четыре часа после подкожного введения субъекту. Быстродействующие инсулины включают любой инсулин или любую композицию быстродействующего инсулина для однократного введения диабетическому субъекту в ответ на фактическое, ощущаемое или предполагаемое гипергликемическое состояние у субъекта, возникающее в момент введения быстродействующего инсулина или в течение примерно четырех часов после введения быстродействующего инсулина (например, прандиальное гипергликемическое состояние, которое возникает в результате приема пищи или которое должно возникнуть в результате приема пищи), при этом быстродействующий инсулин способен предотвращать, контролировать или улучшать острое гипергликемическое состояние. Быстродействующие инсулины включают рекомбинантные инсулины и выделенные инсулины (также называемые "регулярными" инсулинами), такие как инсулин, продаваемый как инсулин человека, свиные инсулины и бычьи инсулины, а также быстродействующие аналоги инсулина, сконструированные для быстрого действия с помощью введения замен аминокислот. Примеры препаратов регулярного инсулина включают регулярные инсулины человека, такие как инсулины, продаваемые под торговыми марками Humulin® R, Novolin® R и Velosulin, инсулин человека, USP, и инъекции инсулина человека, USP, а также кислые лекарственные формы инсулина, такие как, например, Toronto Insulin, Old Insulin и Clear Insulin, и регулярные инсулины свиньи, такие как Pletin II® (свиной инсулин), но не ограничиваются ими. Регулярные инсулины, как правило, начинают действовать через 30 мин - 1 ч, и максимальный уровень инсулина достигается через 2-5 ч после введения.

В настоящем документе быстродействующие аналоги инсулина представляют собой инсулины, которые начинают действовать быстро. Быстрые инсулины, как правило, представляют собой аналоги инсулина, которые были разработаны, например, путем введения одной или нескольких аминокислотных замен, чтобы действовать быстрее, чем регулярные инсулины. Быстродействующие аналоги инсулина, как правило, начинают действовать через 10-30 мин после инъекции, максимальный уровень инсулина наблюдается через 30-90 мин после инъекции. Примерами быстродействующих аналогов инсулина являются аналоги инсулина человека, содержащие одно или несколько изменений аминокислотной последовательности А-цепи и/или В-цепи инсулина человека, приведенных в SEQ ID NO: 862 или 863 соответственно, и которые начинают действовать через 10-30 мин после инъекции, при достижении пикового уровня инсулина через 30-90 мин после инъекции. Примеры быстродействующих аналогов инсулина включают, например, инсулин лизпро (например, инсулин Humalog®), инсулин аспарт (например, инсулин NovoLog®) и инсулин глулизин (например, инсулин Apidra®), композицию быстродействующего аналога инсулина, которая продается как VIAject® и VIAtab® (см., например, патент США № 7279457), но не ограничиваются ими. Аминокислотная последовательность приведенных в качестве примера быст-

родействующих аналогов инсулина включает А-цепь с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 862, и В-цепь с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS:865-867. Также включены любые другие инсулины, которые начинают действовать через 30 мин или меньше и имеют пиковый уровень через 90 мин, как правило, через 30-90 мин после инъекции.

В настоящем документе инсулин человека относится к инсулину, полученному синтетическим или рекомбинантным путем, основываясь на полипептиде человека, в том числе его аллельных вариантах или аналогах.

В настоящем документе быстродействующие инсулины человека или композиции быстродействующего инсулина человека включают любой инсулин человека или композиции инсулина человека, являющиеся быстродействующими, но исключают не человеческие инсулины, например регулярный инсулин свиньи.

В настоящем документе термины "базально действующие инсулины" или "базальные инсулины" относятся к инсулинам, которые вводят для поддержания базального уровня инсулина в рамках общей схемы лечения хронического состояния, такого как диабет. Как правило, лекарственные формы базально действующего инсулина составлены таким образом, чтобы поддерживать приблизительно постоянный уровень инсулина путем контролируемого высвобождения инсулина при периодическом введении (например, один или два раза в день). Базально действующие инсулины включают кристаллические инсулины (например, NPH и Ленте®, протамин-инсулин, сурфен-инсулин), базальные аналоги инсулина (инсулин гларгин, НОЕ 901, NovoSol Basal) и другие химические лекарственные формы инсулина (например, суспензии с аравийской камедью, лецитином или масляные суспензии), которые замедляют скорость абсорбции регулярного инсулина. В настоящем документе базально действующие инсулины могут включать инсулины, которые обычно считают инсулинами пролонгированного действия (как правило, достигается относительно низкая пиковая концентрация, в то время как максимальная продолжительность действия составляет примерно 20-30 ч) или средней продолжительности действия (как правило, максимальная концентрация инсулина достигается примерно через 4-12 ч после введения).

В настоящем документе лечение означает любой способ облегчения или иного благотворного изменения симптомов или другого показателя состояния, расстройства или заболевания.

В настоящем документе терапевтический эффект означает эффект лечения субъекта, который изменяет, как правило, улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния, или который лечит заболевание или состояние. Терапевтически эффективное количество относится к такому количеству композиции, молекулы или соединения, которое приводит к терапевтическому эффекту после введения субъекту.

В настоящем документе термин "субъект" относится к животному, в том числе к млекопитающему, такому как человек.

В настоящем документе пациент относится к субъекту, являющемуся человеку, проявляющему симптомы заболевания или расстройства.

В настоящем документе облегчение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, например, путем введения фармацевтической композиции или другого терапевтического агента, относится к любому уменьшению, постоянному или временному, длительному или кратковременному, симптомов, которое может приписываться или может быть связано с введением композиции или терапевтического агента.

В настоящем документе предотвращение или профилактика относятся к способам снижения риска развития заболевания или состояния.

В настоящем документе "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" относятся к такому количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которого, по меньшей мере, достаточно для получения терапевтического эффекта. Таким образом, это такое количество, которое необходимо для предотвращения, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптомов заболевания или расстройства.

В настоящем документе единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим для человека и животных и упакованным по отдельности, как известно в данной области техники.

В настоящем документе лекарственная форма для однократного введения (одноразовая лекарственная форма) относится к лекарственной форме, содержащей однократную дозу терапевтического агента для непосредственного введения. Лекарственные формы для однократного введения обычно не содержат никаких консервантов.

В настоящем документе лекарственная форма для многократного введения (многодозовые лекарственные формы) относится к лекарственной форме, которая содержит множество доз терапевтического агента и который может быть введен непосредственно для получения нескольких однократных доз терапевтического агента. Дозы можно вводить в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Лекарственные формы для многократного введения позволяют корректировать дозу, объединять дозу и/или разбивать дозу. Поскольку лекарственные формы для многократного введения используют в течение времени, они обычно содержат один или несколько консервантов для предотвращения роста микроорганизмов.

В настоящем документе "изделие" представляет собой продукт, который производится и продается. В рамках настоящего документа термин предназначен для обозначения терапевтического агента вместе с растворимым PH20, таким как esPH20, или esPH20 отдельно, содержащихся в одной и той же упаковке или отдельных упаковках.

В настоящем документе жидкость относится к любой композиции, которая может течь. Жидкости, таким образом, включают композиции в полутвердой форме, пасты, растворы, водные смеси, гели, лосьоны, крема и другие такие композиции.

В настоящем документе "контроль" или "стандарт" относится к образцу, который, по существу, идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что на него не оказывает влияние тестируемый параметр, или, если это образец плазмы, он может быть получен от нормального волонтера, у которого нет исследуемого состояния. Контроль также может быть внутренним контролем. Например, контроль может представлять собой образец, такой как вирус, с известным свойством или активностью.

В настоящем документе формы единственного числа также включают указание множественного числа, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, "агент" включает один или несколько агентов.

В настоящем документе термин "или" используется для обозначения "и/или", если явно не используется для обозначения только альтернативы или если альтернативы не являются взаимоисключающими.

В настоящем документе интервалы и значения могут быть выражены как "примерно" конкретное значение или интервал. Примерно также включает точное значение. Следовательно, "примерно 5 оснований" означает "примерно 5 оснований" и также "5 оснований".

В настоящем документе термины "необязательный" или "необязательно" означают, что описанные события или обстоятельства происходят или не происходят, и что описание включает примеры, в которых указанное событие или обстоятельство происходит, и примеры, в которых оно не происходит. Например, необязательно замещенная группа означает, что группа является незамещенной или замещенной.

В настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, соответствуют широко используемым общепризнанным аббревиатурам, или биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (см. (1972), *Biochem.* 11:1726).

Для ясности описания, а не для ограничения изобретения ниже приведено подробное описание, которое разделено на подразделы.

В. Гиалуронидаза PH20

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20. PH20 (также известный как поверхностный белок сперматозоида, молекула адгезии сперматозоида 1 или SPAM1) представляет собой гиалуронидазу, которая гидролизует гиалуронан (также называемый гиалуроново́й кислотой, гиалуронатом или HA) и находится в соединительных тканях, таких как внеклеточный матрикс. Полимеры гиалуронана состоят из повторяющихся дисахаридных единиц, D-глюкуроновой кислоты (GlcA) и N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc), попеременно соединенных друг с другом β -1 \rightarrow 4 и β -1 \rightarrow 3 гликозидными связями. Цепи гиалуронана могут иметь в длину примерно 25000 или больше дисахаридных повторов, и полимеры гиалуронана могут варьировать в размере от примерно 5000 до 20000000 Да *in vivo*. Гиалуронан, также называемый гиалуроново́й кислотой или гиалуронатом, представляет собой несulfатированный гликозаминогликан, широко распространенный в соединительных, эпителиальных и нервных тканях. Гиалуронан является важным компонентом внеклеточного матрикса и основной составляющей интерстициального барьера. PH20 представляет собой эндо- β -N-ацетилгексозаминидазу, которая гидролизует β 1 \rightarrow 4 гликозидную связь гиалуроново́й кислоты, что приводит к образованию олигосахаридов различной длины, таких как тетрасахариды и гексасахариды. PH20 имеет как гидролитическую, так и трансгликозидазную активность. В дополнение к деградации гиалуроново́й кислоты PH20 также может деградировать хондроитинсульфаты, такие как C4-S и C6-S. PH20 может проявлять гиалуронидазную активность при кислом pH и нейтральном pH.

1. Структура.

кДНК PH20 была клонирована из многочисленных видов млекопитающих. Примеры полипептидо-предшественников PH20 включают, но не ограничиваются ими, полипептиды PH20 человека (SEQ ID NO: 6), быка (SEQ ID NOS: 15 или 17), кролика (SEQ ID NO: 23), яванского макака (SEQ ID NO: 13), морской свинки (SEQ ID NO: 28), крысы (SEQ ID NO: 21), мыши (SEQ ID NO: 19), шимпанзе (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 869), макаки-резус (SEQ ID NO: 11), лисы (SEQ ID NO: 30), гиббона (SEQ ID NO: 856), игрунки (SEQ ID NO: 858) или орангутанга (SEQ ID NO: 860). мРНК транскрипт, как правило, транслируется с образованием белка-предшественника, содержащего на N-конце сигнальную последовательность длиной 35 аминокислот. После транспорта в ER сигнальная последовательность удаляется с образованием зрелого полипептида PH20. Примеры зрелых полипептидов PH20 включают, но не ограничиваются ими, полипептиды PH20 человека (SEQ ID NO: 7), быка (SEQ ID NOS: 16 или 18), кролика (SEQ ID NO: 24), яванского макака (SEQ ID NO: 14), морской свинки (SEQ ID NO: 29), крысы (SEQ ID NO: 22), мыши (SEQ ID NO: 20), шимпанзе (SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 870), макаки-резус (SEQ ID NO: 12), лисы (SEQ ID NO: 31), гиббона (SEQ ID NO: 857), игрунки (SEQ ID NO: 859) или оран-

гутанга (SEQ ID NO: 861). Например, мРНК транскрипт PH20 человека обычно транслируется с образованием белка-предшественника длиной 509 аминокислот (SEQ ID NO: 6), содержащего на N-конце сигнальную последовательность длиной 35 аминокислот (позиции аминокислотных остатков 1-35 в SEQ ID NO: 6). Таким образом, после транспорта в ER и удаления сигнального пептида образуется зрелый полипептид длиной 474 аминокислоты с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7. Также известны последовательности PH20 овцы (см., например, SEQ ID NOS: 25-27).

В частности, PH20 человека имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6. Зрелый PH20 человека без сигнальной последовательности приведен в SEQ ID NO: 7. Известны аллельные варианты и другие варианты PH20. Сообщалось о других последовательностях PH20. Например, известен вариант PH20, приведенный в виде последовательности полипептида-предшественника, который приведен в SEQ ID NO: 68, содержащий Ala в позиции 48 и Trp в позиции 499, или его зрелая последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 69, содержащая соответствующие изменения в позициях 13 и 464 соответственно, по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7 (см., например, Gmachl et al. (1993) FEBS Lett., 336:545-548; GenBank Accession No. AAC60607). Также был идентифицирован природный вариант PH20, содержащий глутамин (Gln; Q) в позиции 5 по сравнению с последовательностью аминокислот полипептида-предшественника, приведенной в SEQ ID NO: 6 (см., например, SEQ ID NO: 70, см. также Varela et al. (2011) Nature, 469:539-542). Другой природный вариант содержит аланин (Ala; A) в позиции 47 по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 6 (как приведено в SEQ ID NO: 71), что соответствует позиции 12 по сравнению с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7 (как приведено в SEQ ID NO: 72).

Последовательность и структура полипептидов PH20 высококонсервативны. Идентичность последовательности между белками PH20 разных видов варьирует примерно от 50 до 90%. Гидрофобная N-концевая сигнальная последовательность длиной 35 аминокислот обычно является консервативной среди полипептидов гиалуронидаз PH20. Гиалуронидазы PH20 содержат общую коровую область гиалуронидазного домена, имеющую в длину примерно 340 аминокислот, соответствующую аминокислотным остаткам 38-374 последовательности полипептида-предшественника PH20 человека, приведенной в SEQ ID NO: 6. Зрелый полипептид PH20 без сигнальной последовательности, содержащий непрерывную последовательность аминокислот, имеющую C-концевой аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку 464 в SEQ ID NO: 6 (например, аминокислотные остатки, соответствующие позициям 36-464 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6), представляет собой минимальную последовательность, необходимую для проявления гиалуронидазной активности (см., например, патентную заявку США № 10795095, которая опубликована как патент США № 7767429; см. также опубликованную заявку США № US 20100143457).

В пределах общего гиалуронидазного домена по меньшей мере 57 аминокислот являются консервативными для видов (см., например, Arming et al. (1997) Eur. J. Biochem., 247:810-814; ten Have et al. (1998) Reprod. Fertil. Dev., 10:165-72; Chowpongpan et al. (2004) Biotechnology Letters, 26:1247-1252). Например, гиалуронидазы PH20 содержат 12 консервативных остатков цистеина, соответствующих аминокислотным остаткам 25, 189, 203, 316, 341, 346, 352, 400, 402, 408, 423 и 429 последовательности аминокислот зрелого PH20 без сигнальной последовательности, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 3 или 7 (соответствуют аминокислотным остаткам 60, 224, 238, 351, 376, 381, 387, 435, 437, 443, 458 или 464 полноразмерного PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 6). Остатки цистеина, соответствующие позициям 25 и 316, и остатки цистеина, соответствующие позициям 189 и 203, формируют дисульфидные мостики. Другие остатки цистеина также формируют дисульфидные мостики и участвуют в посттрансляционном созревании белка и/или в регуляции активности. Например, другие четыре дисульфидные связи формируются между остатками цистеинов C376 и C387; между C381 и C435; между C437 и C443 и между C458 и C464 полипептида, приведенного в качестве примера в SEQ ID NO: 6 (соответствуют позициям C341 и C352; C346 и C400; C402 и C408 и C423 и C429 зрелого полипептида, приведенного в SEQ ID NO: 3 или 7 соответственно).

Аминокислотные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам D111, E113 и E249 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7, являются кислотными остатками, которые представляют собой часть активного сайта фермента, и являются консервативными для различных PH20. Аминокислотные остатки R176, R246, R252 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7, также являются консервативными для различных видов и участвуют в связывании субстрата и/или проявлении гиалуронидазной активности. Мутации аминокислот D111N, E113Q, R176G, E249N и R252T приводят к образованию фермента, у которого не обнаруживается энзиматическая активность или у которого проявляется только остаточная энзиматическая активность (см., например, Arming et al. (1997) Eur. J. Biochem., 247:810-814).

Полученные в настоящем документе результаты подтверждают необходимость аминокислотных остатков PH20, соответствующих позициям 25, 111, 113, 176, 189, 203, 246, 249, 252, 316, 341, 346, 352, 400, 402, 408, 423 и 429 в последовательности аминокислот зрелого PH20 без сигнальной последовательности, такого как приведенный в SEQ ID NO: 3 или 7, для проявления гиалуронидазной активности, поскольку мутагенез этих остатков приводит к образованию неактивного фермента (например, он не экс-

прессуруется или экспрессируется в неактивной форме, см., например, табл. 5 и 10). Исключением являются аминокислотные замены, соответствующие R176K и C316D, которые приводят к образованию му-тантов с некоторой остаточной гиалуронидазной активностью.

Гликозилирование на основе мотива NxS или NxT также необходимо для проявления гиалурони-дазной активности PH20. Шесть N-связанных олигосахаридов находятся в аминокислотных позициях, соответствующих позициям N47, N131, N200, N219, N333 и N358 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7 (соответствуют аминокислотным остаткам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 PH20 человека, приведенного в SEQ ID NO: 6). В частности для секреции и/или активности фермента необходимы, по меньшей мере, сайты N-гликозилирования, соответствующие аминокислот-ным остаткам N200, N333 и N358 (см., например, опубликованную заявку США № US 20100143457). Например, полипептид PH20, содержащий аминокислотные мутации N200A, N333A, N358A или N333A/N393A, приводит к образованию неактивных белков. Единичные мутации сайтов гликозилирова-ния N47A, N131A, N219A, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N291A приводят к белкам, сохраняющим активность. Сайт N-гликозилирования, соответствующий аминокислотному остатку N368 PH20 челове-ка, приведенного в SEQ ID NO: 6, является консервативным для различных видов (см., например, Chow-pongprang et al. (2004) *Biotechnology Letters*, 26:1247-1252). Гиалуронидазы PH20 также содержат сайты O-гликозилирования. Например, PH20 человека имеет один O-связанный олигосахарид при аминокис-лотном остатке, соответствующем аминокислоте T440 в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 7 (соответствует аминокислотному остатку T475 в SEQ ID NO: 6).

В дополнение к каталитическим сайтам PH20 также содержит сайт связывания гиалуронана. Сайт локализован в области пептида 2, которая соответствует аминокислотным позициям 205-235 полипепти-да-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 6, и позициям 170-200 зрелого полипептида, приведен-ного в SEQ ID NO: 3 или 7. Эта область является высококонсервативной среди гиалуронидаз и аналогич-на мотиву связывания гепарина. Мутация остатка аргинина в позиции 176 (соответствующей зрелому полипептиду PH20, приведенному в SEQ ID NO: 3 или 7) на глицин приводит к образованию полипепти-да, обладающего только примерно 1% от гиалуронидазной активности полипептида дикого типа (Arming et al., (1997), *Eur. J. Biochem.* 247:810-814).

Полипептиды PH20 содержат гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь, присоединенный к С-концу белка и заякоривающий белок во внеклеточном слое плазматической мембраны клетки, по мень-шей мере, PH20 человека, обезьяны, мыши и морской свинки прочно присоединены к плазматической мембране посредством GPI якоря, который можно удалить обработкой фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой C (PI-PLC; см., например, Lin et al. (1994) *Journal of Cell Biology*, 125:1157-1163; Lin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:10071-10075). Другие ферменты PH20, такие как PH20 бы-ка, непрочно соединены с плазматической мембраной и не заякорены посредством якоря, чувствительно-го к фосфолипазе. Как обсуждается ниже, растворимые активные формы, которые, когда они экспресси-руются, не присоединены к мембране, но секреторируются, могут быть получены за счет удаления всей сигнальной последовательности присоединения GPI якоря или ее части (см. также патент США № 7767429; опубликованную заявку США № US 20100143457). Такие формы включают, например, раство-римые полипептиды PH20, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или их формы-предшественники, содержащие сигнальную последовательность.

GPI-заякоренные белки, например, PH20 человека, транслируются с отщепляемым N-концевым сигнальным пептидом, который направляет белок в эндоплазматический ретикулум (ER). На С-конце таких белков присутствует другая сигнальная последовательность, которая определяет присоединение сформированного GPI-якоря к полипептиду в просвете ER. Присоединение GPI якоря происходит после отщепления С-концевой части по специфичной аминокислотной позиции, называемой ω -сайтом (как правило, локализован приблизительно на расстоянии 20-30 аминокислот от С-конца). Несмотря на то, что для идентификации расположения ω -сайта, по-видимому, не существует консенсусной последо-вательности, GPI-заякоренные белки содержат С-концевую сигнальную последовательность сайта или до-мена присоединения GPI-якоря, которая, как правило, содержит преимущественно гидрофобную область из 8-20 аминокислот, перед которой расположена гидрофильная спейсерная область из 8-12 аминокислот сразу после ω -сайта. Эта гидрофильная спейсерная область часто богата заряженными аминокислотами и пролином (White et al. (2000) *J. Cell Sci.* 113(Pt.4):721-727). Обычно существует область приблизительно из 11 аминокислот перед ω -1 позицией, характеризующаяся низким уровнем предсказанной вторичной структуры, область вокруг сайта расщепления (ω -сайт), от ω -1 до ω +2, характеризующаяся присутствием остатков с небольшими боковыми цепями, спейсерная область между позициями ω +3 и ω +9, и гидро-фобный хвост от ω +10 до С-конца (Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392).

Несмотря на то, что не существует консенсусная сигнальная последовательность сайта присоеди-нения GPI-якоря, были разработаны различные *in silico* способы и алгоритмы, которые могут быть исполь-зованы для идентификации таких последовательностей в полипептидах (см., например, Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al. (1999) *J. Mol. Chem.* 292: 741-758; Kronegg and Bul-oz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)",

129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al. (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria et al. (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al. (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), в том числе и те, которые легко доступны на биоинформатических веб-сайтах, таких как сайт ExPASy Proteomics tools (expasy.ch/tools/). Таким образом, специалист в данной области способен определить, содержит ли полипептид PH20 сигнальную последовательность сайта присоединения GPI-якоря и, следовательно, является ли полипептид PH20 GPI-заякоренным белком.

Ковалентное присоединение GPI-якоря к С-концу PH20 человека и, следовательно, связывание PH20 с мембраной, было подтверждено в исследованиях с использованием гидролиза фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой С (PI-PLC) (см., например, Lin et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 125:1157-1163). Фосфатидилинозитол-специфичные фосфолипазы С (PI-PLC) и D (PI-PLD) гидролизуют GPI якорь, высвобождая полипептид PH20 от мембраны клетки. По литературным данным из предшествующего уровня техники сайт расщепления ω -сайта PH20 человека находится между Ser-490 и Ala-491, а для PH20 обезьяны сайт расщепления ω -сайта находится между Ser491 и Thr492 (Lin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993) 90:10071-10075). Таким образом, по литературным данным сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря PH20 человека локализована в аминокислотных позициях 491-509 полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 6, и ω -сайт представляет собой аминокислоту в позиции 490. Таким образом, при этом моделировании PH20 человека аминокислоты 491-509 отщепляются после транспорта в ER, и GPI якорь ковалентно присоединяется к остатку серина в позиции 490.

2. Функция.

PH20 обычно экспрессируется в сперматозоиде как продукт единственного специфичного для семенников гена. PH20 представляет собой ассоциированный со сперматозоидом белок, участвующий в оплодотворении. PH20 обычно локализуется на поверхности сперматозоида и в акросомах лизосомального происхождения, в которых он связан с внутренней акросомальной мембраной. PH20 является мультифункциональным и обладает гиалуронидазной активностью, активностью гиалуронан (HA)-опосредованной клеточной сигнализации и функционирует в качестве рецептора сперматозоида для вителлиновой оболочки, окружающей ооцит, когда находится в сперматозоиде на стадии акросомной реакции (AR). Например, PH20 в природе участвует в адгезии сперматозоида и яйцеклетки и способствует проникновению сперматозоида в слой кумулюсных клеток за счет расщепления гиалуронової кислоты. В дополнение к тому, что PH20 является гиалуронидазой, PH20 также является, как представляется, рецептором для HA-индуцированной клеточной сигнализации и рецептором для вителлиновой оболочки, окружающей ооцит. Вследствие того, что PH20 играет роль в оплодотворении, PH20 можно использовать в качестве антигена для иммуоконтрацепции.

PH20 представляет собой гиалуронидазу, активную в нейтральных условиях, несмотря на то, что в некоторых случаях PH20 может проявлять активность в кислых условиях. Гиалуронидазная активность PH20 проявляется PH20, ассоциированным с плазматической мембраной и внутренней акросомальной мембраной. PH20 плазматической мембраны проявляет гиалуронидазную активность только при нейтральном pH, тогда как PH20, ассоциированный с внутренней акросомальной мембраной, проявляет энзиматическую активность в кислых условиях. Структурная основа для таких различий заключается в наличии двух каталитических сайтов в PH20. Первый каталитический сайт называется областью пептида 1 и соответствует аминокислотным остаткам 142-172 в SEQ ID NO: 6 и участвует в энзиматической активности PH20 при нейтральном pH. Второй каталитический сайт называется областью пептида 3 и соответствует аминокислотным остаткам 277-297 в SEQ ID NO: 6, и участвует в энзиматической активности PH20 при низком pH. В структуре PH20, ассоциированного с внутренней акросомальной мембраной, после акросомной реакции происходят изменения, при этом PH20 эндопротеолитически расщепляется, но удерживается вместе дисульфидными связями. В результате эндопротеолиза активируется область пептида 3 и это, тем самым, может обеспечивать активность PH20 в нейтральных и кислых условиях (см., например, Cherr et al. (2001) *Matrix Biology*, 20:515-525). Также после акросомной реакции в результате высвобождения из внутренней акросомальной мембраны образуются формы с меньшей молекулярной массой (например, у обезьяны образуется 53 кДа растворимая форма PH20). Форма (формы) с меньшей молекулярной массой также проявляют активность в кислых условиях.

Гиалуронидазная активность PH20 обуславливает активность усиления распространения вещества в тканях, наблюдаемую для тестикулярных экстрактов животных, которые применяли в клинической практике в течение десятилетий для увеличения распространения и абсорбции лекарств (см., например, Bookbinder et al. (2006) *J. Controlled Release*, 114:230-241). Например, были разработаны фармацевтические препараты, содержащие гиалуронидазу, которые представляли собой фракционированные экстракты бычьих семенников, для терапевтического применения в качестве усиливающих распространение агентов и для других применений (Schwartzman (1951) *J. Pediat.*, 39:491-502). Препараты тестикулярных экстрактов быка включали, например, экстракты, продаваемые под торговыми марками Wudase®, Hyalase®, "Dessau," Neopermease®, Alidase® и Hyazyme®. Известно, что активность усиления распространения, характерная для препаратов тестикулярных экстрактов, обусловлена гиалуронидазной активностью PH20. Например, в 2001 г. было идентифицировано, что гиалуронидаза сперматозоида быка пред-

ставляет собой гиалуронидазу PH20 (Lalancette et al. (2001) *Biol. Reprod.*, 65:628-36). Катализируя гидролиз гиалуроновой кислоты, гиалуронидаза PH20 уменьшает вязкость гиалуроновой кислоты, тем самым увеличивая проницаемость ткани. Таким образом, растворимые формы PH20 используют в качестве усиливающих распространение или диспергирующих агентов вместе с другими агентами, лекарствами и белками для улучшения их распространения и доставки, и для улучшения фармакокинетического и фармакодинамического профиля совместно вводимого агента, лекарства или белка (см., например, патент США № 7767429; Bookbinder et al. (2006) *J. Controlled Release*, 114:230-241).

3. Растворимые полипептиды PH20.

PH20 может существовать в связанной с мембраной или ассоциированной с мембраной форме или может секретироваться в среду, когда экспрессируется в клетках, и поэтому может существовать в растворимой форме. Растворимый PH20 можно обнаружить и отличить от нерастворимого связанного с мембраной PH20 с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, в том числе с использованием анализа с Triton® X-114, но не ограничиваясь им. В этом анализе растворимые гиалуронидазы PH20 распределяются в водную фазу раствора Triton® X-114 при 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7), тогда как заякоренные в мембране гиалуронидазы PH20 распределяются в фазу, богатую детергентом. Таким образом, для оценки того, является ли полипептид PH20 в естественных условиях GPI-заякоренным и поэтому связанным с мембраной, в дополнение к применению описанных выше алгоритмов также могут быть проведены эксперименты оценки растворимости.

Растворимые ферменты PH20 включают гиалуронидазы, которые содержат сигнальную последовательность присоединения GPI-якоря, но которые слабо присоединены к мембране, так как они не содержат чувствительный к фосфолипазе якорь. Например, растворимые полипептиды PH20 включают овечью или бычью PH20. Различные формы таких растворимых гиалуронидаз PH20 были получены и одобрены для терапевтического применения для различных субъектов, в том числе для людей. Например, препараты гиалуронидаз, полученных из животных, включают Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), очищенную овечью тестикулярную гиалуронидазу, и Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), бычью тестикулярную гиалуронидазу. Растворимые ферменты PH20 также включают укороченные формы не человеческих и человеческих ассоциированных с мембраной гиалуронидаз PH20, у которых отсутствует один или несколько аминокислотных остатков сигнальной последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря, и которые сохраняют гиалуронидазную активность (см., например, патент США № 7767429; опубликованная заявка США № US 20100143457). Таким образом, вместо того, чтобы иметь GPI-якорь, ковалентно присоединенный к С-концу белка в ER, и быть заякоренными во внеклеточном слое плазматической мембраны, такие полипептиды секретируются из клеток, когда они экспрессируются, и являются растворимыми. В примерах, в которых растворимый деградирующий гиалуронан фермент сохраняет часть сигнальной последовательности присоединения GPI якоря, могут сохраняться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше аминокислотных остатков сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря при условии, что полипептид является растворимым (т.е. секретируется из клеток, когда экспрессируется) и активным.

Примеры растворимых гиалуронидаз, которые являются укороченными с С-конца и не содержат всю сигнальную последовательность присоединения GPI-якоря или ее часть, включают, но не ограничиваются ими, полипептиды PH20 приматов, такие как, например, полипептиды PH20 человека и шимпанзе. Например, растворимые полипептиды PH20 можно получить путем укорочения С-конца полипептида, приведенного в SEQ ID NOS: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 или 870, или его варианта, который обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 или 870, при этом полученный полипептид является активным, растворимым и у него отсутствуют все аминокислотные остатки сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря или их часть.

Примерами растворимых полипептидов PH20 являются укороченные с С-конца полипептиды PH20 человека, являющиеся зрелыми (без сигнальной последовательности), растворимыми и проявляющими активность в нейтральных условиях, которые содержат непрерывную последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, которая имеет на укороченном С-конце, по меньшей мере, аминокислотный остаток 464 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 6, или аминокислотный остаток после аминокислотного остатка 464 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 6. Например, растворимые полипептиды PH20 включают укороченные с С-конца полипептиды, которые содержат, по меньшей мере, непрерывную последовательность аминокислот 36-464 из SEQ ID NO: 6, или включают последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% идентичность последовательности с непрерывной последовательностью аминокислот, которая имеет на укороченном С-конце аминокислотный остаток после аминокислотного остатка 464 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 6, и сохраняют гиалуронидазную активность. Примерами укороченных с С-конца полипептидов PH20 человека являются зрелые полипептиды (без сигнальной последовательности), которые включают непрерывную последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6, в которой

С-концевой остаток представляет собой остаток после остатка 464, например С-концевой остаток представляет собой остаток после аминокислотной позиции 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 или 500 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 6, или их варианты, которые обладают по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, например по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% идентичностью последовательности по сравнению с ними и сохраняют гиалуронидазную активность. Например, приведенные в качестве примера укороченные с С-конца полипептиды PH20 имеют последовательность аминокислот от остатка 36 до остатка 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 или 500 из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, или ее варианты, которые обладают по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, например по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% идентичностью последовательности с ней и сохраняют гиалуронидазную активность. Растворимые полипептиды PH20 включают любые полипептиды PH20, которые имеют последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, например по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66.

В частности, растворимый полипептид PH20 человека представляет собой полипептид, являющийся укороченным после аминокислоты 482 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6. Такой полипептид может быть получен из молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей сигнальную последовательность и кодирующей аминокислоты 36-482, например, приведенной в SEQ ID NO: 1 (содержит сигнальную последовательность IgG каппа) или в SEQ ID NO: 67 (содержит нативную сигнальную последовательность). В результате посттрансляционного процессинга удаляется сигнальная последовательность и высвобождается растворимый рекомбинантный PH20 человека, имеющий длину 447 аминокислот (SEQ ID NO: 3). Продукт, продуцируемый при экспрессии вектора, приведенного в SEQ ID NO: 4 или 5, и содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 67, представляет собой секретируемый продукт, обозначенный gHuPH20, который секретируется в культуральную среду и обладает гетерогенностью на С-конце, так что продукт включает смесь видов молекул, которая может включать любые молекулы, выбранные из SEQ ID NOS: 3 и 44-48, в различной представленности. Как правило, gHuPH20 продуцируется в клетках, которые обеспечивают правильное N-гликозилирование для сохранения активности, таких как клетки млекопитающих, например клетки CHO (например, клетки DG44 CHO). Hylenex® (Halozyme) представляет собой человеческую рекомбинантную гиалуронидазу, полученную генно-инженерными методами в клетках яичника китайского хомячка (CHO), содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую укороченный полипептид PH20 человека (обозначенный gHuPH20).

С. Модифицированные полипептиды PH20

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20 или варианты полипептидов PH20. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают измененной активностью или измененными свойствами по сравнению с полипептидом PH20 дикого типа, нативным полипептидом PH20 или полипептидом PH20 сравнения. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды PH20, которые представляют собой активные мутанты, то есть обладают по меньшей мере 40% от гиалуронидазной активности соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную модификацию (например, аминокислотную замену). В частности, в настоящем документе предусмотрены полипептиды PH20, которые обладают гиалуронидазной активностью и обладают повышенной стабильностью по сравнению с PH20, не содержащим аминокислотную модификацию. Также предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, являющиеся неактивными, которые могут использоваться, например, в качестве антигенов для противозачаточных вакцин.

Модификации могут представлять собой единичную аминокислотную модификацию, такую как единичная аминокислотная замена, вставка или делеция, или множественные аминокислотные модификации, такие как множественные аминокислотные замены, вставки или делеции. Примерами модификаций являются аминокислотные замены, в том числе, одиночные и множественные аминокислотные замены. Аминокислотная замена может быть консервативной заменой, такой как замены, приведенные в табл. 2, или не консервативной заменой, такой как любая замена, описанная в настоящем документе. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут содержать, по меньшей мере, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше модифицированных позиций по сравнению с полипептидом, не содержащим модификации.

Описанные в настоящем документе модификации могут быть введены в любой полипептид PH20, в том числе в полипептид-предшественник, зрелый полипептид или в укороченную с С-конца форму, при условии, что модифицированная форма обладает гиалуронидазной активностью. Например, полипептиды PH20 содержат модификации по сравнению с полипептидом PH20 дикого типа, нативным полипептидом PH20 или полипептидом PH20 сравнения, приведенным в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72,

856-861, 869 или 870, или полипептиды PH20 содержат модификации в полипептиде, имеющем последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичная любой из SEQ ID NOS: 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870. Например, модификации могут быть введены в полипептид PH20 человека, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 72 или приведенную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 72; полипептид PH20 быка, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NOS: 16 или 18 или приведенную в SEQ ID NOS: 16 или 18; полипептид PH20 кролика, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 24 или приведенную в SEQ ID NO: 24; полипептид PH20 яванского макака, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 14 или приведенную в SEQ ID NO: 14; полипептид PH20 морской свинки, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 29 или приведенную в SEQ ID NO: 29; полипептид PH20 крысы, имеющий последовательность аминокислот включающую SEQ ID NO: 22 или приведенную в SEQ ID NO: 22; полипептид PH20 мыши, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 20 или приведенную в SEQ ID NO: 20; полипептид PH20 шимпанзе, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 10 или 870 или приведенную в SEQ ID NO: 10 или 870; полипептид PH20 макака-резус, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 12 или приведенную в SEQ ID NO: 12; полипептид PH20 лисы, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 31 или приведенную в SEQ ID NO: 31; полипептид PH20 гиббона, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 857 или приведенную в SEQ ID NO: 857; полипептид PH20 игрунки, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 859 или приведенную в SEQ ID NO: 859; полипептид PH20 орангутанга, имеющий последовательность аминокислот, включающую SEQ ID NO: 861 или приведенную в SEQ ID NO: 861; или в полипептид PH20 овцы, имеющий последовательность аминокислот, включающую любую из SEQ ID NOS: 25-27 или приведенную в любой из SEQ ID NOS: 25-27; или в вариант последовательности или в укороченный вариант, который обладает по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-27, 29, 31, 69, 72, 857, 859, 861 или 870.

В частности, в настоящем документе предусмотрены полипептиды PH20, которые содержат модификации по сравнению с полипептидом PH20, приведенным в SEQ ID NO: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или полипептидом, имеющим последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97%, 98, 99% идентична любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. Например, предусмотренные в настоящем документе модификации также могут быть введены в полипептид PH20, приведенный в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 24, 857, 859, 861 или 870.

В частности, в настоящем документе предусмотрены модифицированные растворимые полипептиды PH20, являющиеся полипептидами PH20, содержащими предусмотренные в настоящем документе модификации, которые при экспрессии из клеток секретируются в среду в виде растворимого белка. Например, модификации введены в растворимый полипептид PH20, который является укороченным с С-конца внутри С-концевой части, содержащей сигнальную последовательность GPI-якоря полипептида PH20, который содержит сигнальную последовательность GPI-якоря, или рядом с ней. Укорочение с С-конца может представлять собой укорочение или делецию 8 непрерывных аминокислот на С-конце, укорочение или делецию 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или большего числа аминокислот на С-конце, при условии, что полученный укороченный с С-конца полипептид обладает гиалуронидазной активностью и секретируется из клеток (например, в среду), когда экспрессируется. В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модификации введены в растворимый полипептид PH20, являющийся укороченным с С-конца полипептидом с SEQ ID NO: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 или 870, или предусмотренные в настоящем документе модификации введены в его вариант, который обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 7, 10, 12, 14, 69, 72, 857, 859, 861 или 870. В частности, предусмотренные в настоящем документе модификации введены в растворимый или укороченный с С-конца полипептид PH20 человека, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NOS: 3 или 32-66, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3 или 32-66. Например, предусмотренные в настоящем документе полипептиды PH20 содержат аминокислотные замены, вставки или делеции, укорочения или их комбинации по сравнению с полипептидом PH20, приведенным в SEQ ID NO: 3.

Модификации также могут быть введены в соответствующую форму полипептида-предшественника, содержащую сигнальный пептид, из любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-27, 29, 31, 32-66, 69, 72, 857, 859, 861 или 870. Например, предусмотренные в настоящем документе модификации могут быть введены в форму полипептида-предшественника, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 2, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 28, 30, 856, 858, 860 или 869, или в ее вариант, который

обладает, по меньшей мере, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 2, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 28, 30, 856, 858, 860 или 869.

В примерах предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов PH20 модифицированный полипептид PH20 не содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 3-66, 68-72, 856-861, 869 или 870. Как правило, модифицированный полипептид PH20 представляет собой полипептид человека PH20, и не содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 8-31, 856-861, 869 или 870.

Обычно, в полипептиде PH20 могут быть введены любые модификации, такие как аминокислотная замена, делеция или замена, при условии, что эта модификация не является аминокислотной заменой, которая является одиночной аминокислотной заменой V12A, N47A, D111N, E113Q, N131A, R176G, N200A, N219A, E249Q, R252T, N333A или N358A. Также если модифицированный полипептид PH20 содержит только две аминокислотные замены, это не могут быть аминокислотные замены P13A/L464W, N47A/N131A, N47A/N219A, N131A/N219A или N333A/N358A. В другом примере если модифицированный полипептид PH20 содержит только три аминокислотные замены, это не могут быть аминокислотные замены N47A/N131A/N219A. Примеры предусмотренных в настоящем документе модификаций подробно описаны ниже.

В настоящем документе указание позиций и аминокислот для модификаций, в том числе для аминокислотной замены или замен, дано со ссылкой на полипептид PH20, приведенный в SEQ ID NO: 3. Специалист в данной области техники может ввести любые предусмотренные в настоящем документе модификации в другой полипептид PH20 путем идентификации соответствующих аминокислотных остатков в другом полипептиде PH20, таком как любой полипептид PH20, приведенный в SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24-27, 28, 29, 30, 31, 32-66, 68-72, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 869 или 870, или его вариант, который обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24-27, 28, 29, 30, 31, 32-66, 68-72, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 869 или 870. Соответствующие позиции в другом полипептиде PH20 можно идентифицировать выравниванием полипептида PH20 относительно полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 3. Например, на фиг. 2 показано выравнивание полипептидов PH20, приведенных в качестве примеров, с SEQ ID NO: 3, и идентификация соответствующих позиций. Также, поскольку SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 и 72 представляют собой полноразмерные формы зрелого PH20 человека с различным С-концевым остатком, нумерация аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NOS: 7, 32-66, 69 и 72 совпадает с нумерацией в SEQ ID NO: 3, и, таким образом, соответствующие остатки в каждой из них идентичны остаткам, которые приведены в SEQ ID NO: 3 (см., например, фиг. 1). Более того, SEQ ID NOS, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 2, 6, 70 или 71, представляют собой их полипептиды-предшественники, которые отличаются только присутствием сигнальной последовательности. Для модификации (например, аминокислотной замены) соответствующий аминокислотный остаток может представлять собой любой аминокислотный остаток, и он не обязательно должен быть идентичным остатку, приведенному в SEQ ID NO: 3. Как правило, соответствующий аминокислотный остаток, идентифицированный выравниванием с остатками в SEQ ID NO: 3, представляется собой аминокислотный остаток, являющийся идентичным таковому в SEQ ID NO: 3, или представляет собой консервативный или полуконсервативный с ним аминокислотный остаток (см. например, Фиг. 2). Также понятно, что приведенные в качестве примера замены, предусмотренные в настоящем документе, могут быть осуществлены для соответствующего остатка полипептида PH20, при условии, что заменяющий остаток отличается от того остатка, который присутствует в не модифицированной форме полипептида PH20. Основываясь на этом описании, специалист в данной области техники может получить модифицированный полипептид PH20, содержащий любую одну или несколько описанных мутаций, и протестировать каждый модифицированный полипептид PH20 на свойства или активность, как описано в настоящем документе.

Модификации в полипептиде PH20 также можно ввести в полипептид PH20, который также содержит другие модификации, в том числе модификации первичной последовательности и модификации не в первичной последовательности полипептида. Например, описанные в настоящем документе модификации могут введены в полипептид PH20, который представляет собой полипептид слияния или химерный полипептид. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 также включают полипептиды, конъюгированные с полимером, таким как PEG реагент.

Также в настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют любые предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20. В конкретных примерах последовательность нуклеиновой кислоты может быть последовательностью с оптимизированными кодонами, например, для увеличения уровня экспрессии кодирующей последовательности. Частота использования конкретного кодона зависит от организма-хозяина, в котором экспрессируется модифицированный полипептид. Специалист в данной области техники знает оптимальные кодоны для экспрессии в клетках млекопитающих или человека, бактерий или дрожжей, в том числе, например в *E. coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. Например, информация о частоте использования кодона доступна из

базы данных Codon Usage Database, доступной на kazusa.or.jp/codon (см. Richmond (2000) *Genome Biology*, 1:241 для описания базы данных). См., также, Forsburg (1994) *Yeast*, 10:1045-1047; Brown et al. (1991) *Nucleic Acids Research*, 19:4298; Sharp et al. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 12:8207-8211; Sharp et al. (1991) *Yeast*, 657-78). В некоторых примерах кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты также могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать гетерологичную сигнальную последовательность для изменения (например, увеличения) экспрессии и секреции полипептида. Примером гетерологичной сигнальной последовательности является нуклеиновая кислота, кодирующая сигнальную последовательность IgG капа (приведена в SEQ ID NO: 868).

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды и кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот могут быть получены стандартными методами рекомбинантных ДНК, известными специалистам в данной области техники. Для мутации одной или нескольких аминокислот в целевом белке можно использовать любой известный в данной области способ. Способы включают стандартный сайт-направленный или случайный мутагенез кодирующих молекул нуклеиновых кислот или способы твердофазного пептидного синтеза. Например, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид RH20, можно подвергнуть мутагенезу, такому как случайный мутагенез кодирующей нуклеиновой кислоты, ПЦР с внесением ошибок, сайт-направленный мутагенез, ПЦР с перекрывающимися праймерами, генная перетасовка или другой рекомбинантный метод. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, могут быть введены в клетку-хозяина для гетерологичной экспрессии. Таким образом, также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды. В некоторых примерах модифицированные полипептиды RH20 получают синтетическим путем, например, с использованием твердофазного пептидного синтеза или пептидного синтеза в растворе.

В подразделах ниже в качестве примеров описаны предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, обладающие измененными свойствами и активностью, и кодирующие их молекулы нуклеиновых кислот.

1. Активные мутанты.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, которые могут содержать одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде RH20 и могут проявлять гиалуронидазную активность. Модифицированные полипептиды RH20 могут проявлять от 40 до 5000% от гиалуронидазной активности полипептида RH20 дикого типа или полипептида RH20 сравнения, такого как полипептид, приведенный в SEQ ID NOS: 3 или 7. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20 проявляют по меньшей мере 40% гиалуронидазной активности, например по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000% или большую гиалуронидазную активность от гиалуронидазной активности полипептида RH20 дикого типа или полипептида RH20 сравнения, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию (например, аминокислотную замену), например полипептид, приведенный в SEQ ID NO: 3 или 7. Например, примеры позиций, которые могут быть модифицированы, например, путем аминокислотной замены, включают, но не ограничиваются ими, любые позиции, соответствующие позициям 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192, 193, 195, 196, 197, 198, 200, 202, 204, 205, 206, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251, 253, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 297, 298, 300, 301, 302, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 331, 334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351, 353, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 385, 387, 388, 389, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 403, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 425, 426, 427, 428, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 или 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Как правило, аминокислотный остаток, который модифицирован (например, замещен другой аминокислотой) в позиции, соответствующей любой вышеуказанной позиции в полипептиде RH20, представляет собой идентичный остаток, консервативный остаток или полуконсервативный остаток по отношению к аминокислотному остатку, приведенному в SEQ ID NO: 3.

Для сохранения гиалуронидазной активности, модификации, как правило, не делают в тех позициях, которые менее толерантны к изменениям или необходимы для гиалуронидазной активности. Например, обычно модификации не делают в позициях, соответствующих позициям 7, 16, 17, 18, 19, 21, 25, 53, 55, 56, 57, 62, 64, 76, 78, 80, 88, 95, 100, 101, 109, 111, 112, 113, 115, 116, 121, 123, 126, 129, 185, 187, 188,

189, 190, 191, 194, 199, 201, 203, 207, 210, 223, 225, 227, 228, 229, 241, 243, 244, 246, 249, 250, 252, 254, 262, 268, 282, 295, 296, 298, 299, 303, 319, 322, 329, 330, 332, 333, 336, 337, 340, 341, 344, 345, 346, 350, 352, 354, 355, 362, 363, 364, 365, 366, 370, 372, 382, 384, 386, 390, 400, 402, 408, 423, 424, 429, 430, 431 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Также в примерах, где модификации сделаны в любой из позиций 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 58, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 94, 96, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 114, 117, 118, 119, 122, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 192, 193, 195, 197, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 209, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 226, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 242, 245, 247, 248, 251, 253, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 297, 298, 300, 301, 302, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 334, 335, 338, 339, 342, 343, 347, 348, 349, 351, 353, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 383, 385, 387, 388, 389, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 401, 403, 404, 405, 406, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 425, 426, 427, 428, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 или 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, модификация (модификации) не соответствуют аминокислотной замене (заменам), приведенным в табл. 5 или 10 в настоящем документе, которые являются аминокислотными заменами, которые приводят к неактивному полипептиду. Например, если модификация представляет собой модификацию в позиции, соответствующей позиции 2 со ссылкой на SEQ ID NO: 3, модификация не является заменой на гистидин (H), лизин (K), триптофан (W) или тирозин (Y).

Примеры аминокислотных замен в любых указанных выше соответствующих позициях приведены в табл. 3. Указание на соответствующую аминокислотную позицию в табл. 3 дано со ссылкой на позиции, приведенные в SEQ ID NO: 3. Понятно, что замены можно сделать в соответствующей позиции в другом полипептиде PH20 с помощью выравнивания его с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 (см., например, фиг. 1 и 2), при этом соответствующая позиция представляет собой выравненную позицию. В конкретных примерах аминокислотная замена (замены) может быть введена в соответствующую позицию в полипептиде PH20, приведенном в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его варианте, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 обладает по меньшей мере 40% от гиалуронидазной активности соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену. В частности, замена (замены) может быть введена в соответствующую позицию полипептида PH20 человека, например, приведенного в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или его варианта, который обладает по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. В одном из примеров, любая одна или несколько аминокислотных замен введены в SEQ ID NO: 3, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 обладает по меньшей мере 40% от гиалуронидазной активности полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 3.

Активные мутанты

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
1	ACEFG HKNPQ RSTVW	2	ACGILP QSTV	3	EHL Y
4	AISTV	5	H	6	AHKLNR
7	M	8	ILMP	9	KLQRSV
10	DEGHN QRSW	11	DGHKS	12	AEIKLNR ST
13	HSTY	14	DIMV	15	AMV
20	S	22	HMTY	23	D
24	AEGHIK LMNRT VY	26	AEGHIK MPQRS TVWY	27	ADEFHIK LPQRSTW
28	ADEFIL MNPRS TVW	29	AEGHIK LMPRST VW	30	AFGHKL MPQRSTV W
31	ACGHIK LPRSTV WY	32	ACFGH KLMNQ RSTVW Y	33	GMPQRST W
Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
34	AEHKQ RW	35	FHLQT VY	36	ADGHKL NRT
37	FIKMPR WV	38	Y	39	ALNQRTY
40	LW	41	ACDEG IINTVW	42	A
43	NT	44	E	45	IK
46	ACEFHL MNRST VY	47	ADFGH KMQRS TWY	48	FGHIKMN QRSVY
49	IKRSV	50	ACDEH LMQRS VY	51	ANRS
52	NPQRST	54	AFNQS V	58	CGHIKLN PQRSWY
59	QN	60	K	61	FIMV
63	AHIKL MNRST VW	65	R	66	HR
67	FLRVY	68	EGHKL PQRST	69	ACEFGIL MPRTWY
70	ACFGH KLNPRS TVY	71	ADGHL MNQRS	72	ADEHKL MQRSY
73	ACDGH KLMQR STW	74	ACEFG HKL MN PRSVW	75	ACFHLMN QRSTY
77	HK				
79	LTV	81	P	82	AEGHILM NQRSTV
83	FGHKL NQRST V	84	DEFGHI LMNPQ RTWY	85	V
86	ADEFG HIKLM NPRSTV W	87	ACEGHI LMPQR STVY	89	CKMPRW
90	AEGHIK LNQRST W	91	AQR	92	CHLMTV
93	DEFGHI LMNPQ RSTV	94	ACDEF HLMNQ RST	96	DLV

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
97	ACDEF GILNPQ RSWY	98	ACDEHI LMQRS VW	99	ARS
102	ACEGH KLMNQ RSTW				
103	N	104	ACGIK MRST	105	ACGHIPO RSTWV
106	V				
107	FIL	108	G	110	V
114	AGHMS	117	D	118	HKLMNQ V
119	FPQY	120	DFGHIL NPRSTV WY	122	M
124	HLR	125	AHRS	127	AEGHLM NQRSTV W
128	ACGIKL QRSW	130	IR	131	CEFGHIL MQRSTVY
132	ACEFHI KLNQST VY	133	I	134	LTV
135	ACDFG HKLNQ RSWY	136	ACDFHI MNQRS TW	137	ACITACH ILMNRSW Y
139	ACDEF GHKLM RSTV	140	ACDFG HIKLM RVWY	141	ADEFGHL MQRSTV WY
142	CDEGHI KLMNP QRST	143	CEGIKL NV	144	RTW
145	ACDEG HLMNP R	146	ACEGHI KNPQR STVY	147	ACDFGIL MPQRSV WY
148	CFGHIK LQRSTV WY	149	CGKLM QRSTV	150	ACDEFGI LNPRSWY
151	ACGHK LMNQR STVWY	152	ACFIMR TVWY	153	ILS
154	IRTV	155	ACDFG HKLMR STVW	156	ACDGILM QRSTVW
Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
157	W	158	AFGHL QS	159	ADEGHL MNQRSV
160	CFGHIK LMNQR SWVY	161	ACDER SV	162	ADEGHL MPQRSV WY
163	AEGKL QRSTV W	164	LMVW	165	ACDFNRS VWY
166	ACEFG HLNQR TWY	167	ADGHK MNPRS TY	168	H
169	LRV	170	AQNRV	171	IV
172	AC	173	QNR	174	AGHKMN QRSTVW Y
175	EHTVY	176	KL	177	V
178	GKMR				
179	ACEGIK LMNPR STV	180	FGIKM	181	KMQ
182	L	183	EL	184	W
186	Y				
192	ST	193	FGQRS Y	195	AGHILNQ RSTWV
196	EGLNRS TWY	197	ADEFG HKLMQ RSTW	198	ADEHLNQ RSTWY
200	DT	202	M	204	PW
205	LRSTV WY	206	HIKLM QRST	208	ACKLMQ RSTV
209	AEFGLN RST	211	LW		
212	NST	213	AEGHK LMNQR VWY		
214	Q	215	ADEGH KLMQR TVWY	217	M
218	FMV	219	ACDEHI KLMRS TW	220	ADHILMS TV
221	ACIMQT V	222	DFGIKL NRSV	224	I

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
226	W				
230	I	231	T	232	S
233	AFGKLR RY	234	LM	235	AEGHKT
236	AGHKRS	237	ACEFHL NQRST W	238	DEHKQRS T
239	N				
240	KAMPQ RSV	242	F	245	H
247	ILM	248	AHWY	251	LMY
253	I	255	AGNQRS	256	AHLV
257	ACGIKL MNQRT V	258	GHNRS	259	EGIKLNP QRSTVW Y
260	ADEGHL LMQRS Y	261	AFKMN QRTVW	263	AHKMRT V
264	AH	265	I	266	Y
267	MT	269	ACDS	270	MNST
271	FGLMS V	272	DMRST	273	HTY
274	AFS				
275	LV	276	CDEGHI LMRSY	277	ACDEGHK MNQRSTY
278	AEFGHI KNRST VY	279	AHQRT	280	GQ
282	DGMQ	283	EPRST	284	AEGHLM NQSTY
285	AFGHM NQY	286	RSW	287	INT
288	LW	289	KS	290	IM
291	CQRSV	292	ACFGH KNPRV W	293	ACDFGKL MPQSVY
294	M				
297	A	298	GI	300	R
301	AV	302	IW	303	DV
304	GI	305	DEN	306	DES

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
307	GKNQS TVWY	308	DGHKN PRT	309	DEGHKL MNQRSTV W
310	AFGQRS VY	311	GHKQS T	312	GKLNT
313	AEGHK LPRSTV Y	314	ADHIN QRSTY	315	AEGHKL MRTY
316	D	317	ADHIK MNQRS TW	318	DFGHIKM NQRST
320	EGHIKL MNRSW VY	321	ADHKR STY	323	FIL
324	ADHMN RS	325	ADEGH KMNQS VW	326	CKLVY
327	M	328	ACGHIK LQRSTV WY	331	CEV
334	PT	335	S	338	Q
339	M	342	A	343	TV
347	AEGLM RS	348	DGS	349	AEKMNR T
351	ACIQS	353	TV	356	ADHS
357	ACKST	358	CGLT	359	DEHKMT V
360	T				
361	H	367	ACGKR S	368	AEGHKL MRSTVHR S
371	EFGHIK LMRSV	373	AEFKL MRSV	374	AHIMNPR STVWY
375	AGIKL MNRST	376	ADELM QRSTV Y	377	DEHKPRS T
378	KNR	379	GHRST	380	ILPTVWY
381	EHKNQ RSV	383	AEHIKL MNSTV	385	AGHNQRS TV
387	S	388	FHIMRT VWY	389	AGHKLM PQRSTY
391	C	392	AFGKL MQRST VWY	393	ADFHKL MNRST

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
394	L W	395	A G H K R T W	396	A D H L Q R S T
397	R	398	L		
399	A C E K M N Q R S T V W	401	A E G Q N	403	F
404	A P T	405	A F G K M P Q R S W Y	406	A C E F G I N Q S T V Y
407	A D E F G H L M N P Q R V W	409	A D E G H I P Q R S T V	410	D K M N P Q R S T V Y
411	A H N P R S T V	412	D G H I L N Q P R S V W Y	413	A E H K N Q R S T
414	I K L M	415	G S W V Y	416	F G H I K L N Q R T V Y
417	I	418	A E F G I L M N P Q R S V Y	419	E F G H I K L N R S W Y
420	I P	421	A E G H I K L M N Q R S T Y	422	I T
425	G I K M N R S Y	426	E G K N P Q S Y	427	H I K Q S T
428	L M P T	431	A E G H I K L N Q R S V W Y	432	E G H N S V
433	A C D E G H I K L P R S T V W	434	F G I M V	435	A C E G H R S T V Y
436	C D E G H I K L M Q R S T W Y	437	A D G H I K L M Q R S Y	438	A C D E G L N P Q R S T V W
439	A C F G H K L P Q S T V W	440	A D E F G H I L M P R S V Y	441	A D F G H K L N Q S T V Y
442	C G H K L P Q R T V W Y	443	A E F G H L M N Q R S T W	444	D E F G H I K M N R V W Y
445	A G H L M N P Q R S T V W Y	446	A C D E G H I K L M Q R T V W	447	D E F G I L M N P Q R T V W

В конкретных примерах в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену или замены в позиции или позициях, соответствующих позициям 1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 58, 59, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 79, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 97, 102, 104, 107, 114, 118, 120, 127, 128, 130, 131, 132, 135, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 155, 156, 158, 160, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 178, 179, 193, 195, 196, 198, 204, 205, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 220, 221, 222, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 240, 247, 248, 249, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 267, 269, 271, 272, 273, 274, 276, 277, 278, 279, 282, 283, 285, 287, 289, 291, 292, 293, 298, 305, 307, 308, 309, 310, 313, 314, 315, 317, 318, 320, 321, 324, 325, 326, 328, 335, 347, 349, 351, 353, 356, 359, 367, 368, 369, 371, 373, 374, 375, 376, 377, 380, 381, 383, 385, 389, 392, 393, 395, 396, 399, 401, 404, 405, 406, 407, 409, 410, 412, 416, 418, 419, 421, 425, 427, 428, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 или 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, замены в аминокислотных позициях могут представлять собой замены в позициях, соответствующие замене лейцина (L) в позиции 1 (L1), P6, V8, 19, P10, N11, V12, F14, L15, A20, S22, F24, L26, G27, K28, F29, D30, E31, P32, L33, D34, M35, S36, L37, F38, S39, F40, I41, I46, N47, A48, T49, G50, G52, V58, D59, Y63, I67, D68, S69, I70, T71, G72, V73, T74, V75, I79, K82, I83, S84, G86, D87, L89, D90, A92, K93, K94, T97, V102, N104, M107, E114, T118, A120, D127, V128, K130, N131, R132, E135, Q138, Q139, Q140, N141, V142, Q143, L144, L146, T147, E148, A149, T150, E151, K152, Q155, E156, E158, A160, K162, D163, F164, L165, V166, E167, I169, K170, G172, K173, L174, L175, N178, H179, H193, K195, K196, G198, F204, N205, V206, K209, D212, D213, S215, N219, E220, S221, T222, T232, Q233, Q234, S235, P236, V237, A238, T240, V247, R248, E249, P257, D258, A259, K260, S261, L263, A267, T269, I271, V272, F273, T274, Q276, V277, L278, K279, S282, Q283, E285, V287, T289, G291, E292, T293, A298, G305, L307, S308, I309, M310, M313, K314, S315, L317, L318, D320, N321, E324, T325, I326, N328, T335, Q347, Q349, V351, I353, N356, S359, P367, D368, N369, A371, Q373, L374, E375, K376, G377, F380, T381, R383, K385, E389, E392, Q393, S395, E396, Y399, S401, S404, T405, L406, S407, K409, E410, A412,

ствующей позиции 425; Q в позиции, соответствующей позиции 427; T в позиции, соответствующей позиции 427; L в позиции, соответствующей позиции 428; A в позиции, соответствующей позиции 431; G в позиции, соответствующей позиции 431; E в позиции, соответствующей позиции 431; H в позиции, соответствующей позиции 431; K в позиции, соответствующей позиции 431; L в позиции, соответствующей позиции 431; N в позиции, соответствующей позиции 431; Q в позиции, соответствующей позиции 431; R в позиции, соответствующей позиции 431; S в позиции, соответствующей позиции 431; V в позиции, соответствующей позиции 431; A в позиции, соответствующей позиции 433; H в позиции, соответствующей позиции 433; I в позиции, соответствующей позиции 433; K в позиции, соответствующей позиции 433; L в позиции, соответствующей позиции 433; R в позиции, соответствующей позиции 433; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; W в позиции, соответствующей позиции 433; K в позиции, соответствующей позиции 436; I в позиции, соответствующей позиции 437; M в позиции, соответствующей позиции 437; A в позиции, соответствующей позиции 438; D в позиции, соответствующей позиции 438; E в позиции, соответствующей позиции 438; L в позиции, соответствующей позиции 438; N в позиции, соответствующей позиции 438; T в позиции, соответствующей позиции 438; A в позиции, соответствующей позиции 439; C в позиции, соответствующей позиции 439; K в позиции, соответствующей позиции 439; P в позиции, соответствующей позиции 439; Q в позиции, соответствующей позиции 439; T в позиции, соответствующей позиции 439; V в позиции, соответствующей позиции 439; D в позиции, соответствующей позиции 440; H в позиции, соответствующей позиции 440; M в позиции, соответствующей позиции 440; P в позиции, соответствующей позиции 440; R в позиции, соответствующей позиции 440; S в позиции, соответствующей позиции 440; A в позиции, соответствующей позиции 441; F в позиции, соответствующей позиции 441; C в позиции, соответствующей позиции 442; G в позиции, соответствующей позиции 442; R в позиции, соответствующей позиции 442; A в позиции, соответствующей позиции 443; E в позиции, соответствующей позиции 443; F в позиции, соответствующей позиции 443; G в позиции, соответствующей позиции 443; M в позиции, соответствующей позиции 443; N в позиции, соответствующей позиции 443; E в позиции, соответствующей позиции 444; H в позиции, соответствующей позиции 444; V в позиции, соответствующей позиции 444; H в позиции, соответствующей позиции 445; M в позиции, соответствующей позиции 445; N в позиции, соответствующей позиции 445; P в позиции, соответствующей позиции 445; Q в позиции, соответствующей позиции 445; S в позиции, соответствующей позиции 445; T в позиции, соответствующей позиции 445; V в позиции, соответствующей позиции 445; W в позиции, соответствующей позиции 445; A в позиции, соответствующей позиции 446; M в позиции, соответствующей позиции 446; W в позиции, соответствующей позиции 446; D в позиции, соответствующей позиции 447; E в позиции, соответствующей позиции 447; G в позиции, соответствующей позиции 447; I в позиции, соответствующей позиции 447; N в позиции, соответствующей позиции 447; P в позиции, соответствующей позиции 447; Q в позиции, соответствующей позиции 447; T в позиции, соответствующей позиции 447, и/или замену на V в позиции, соответствующей позиции 447, где каждая замена приведена со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Примерами таких модифицированных полипептидов PH20 являются любые полипептиды PH20, имеющие последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 74-855, или имеющие последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90%, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 74-855, и содержащие аминокислотную замену и обладающие гиалуронидазной активностью.

Любой из предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов PH20 может обладать измененными, такими как улучшенными или повышенными, свойствами или активностью по сравнению с соответствующим полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную модификацию (например, аминокислотную замену). Например, измененные активность или свойства могут представлять собой повышенную каталитическую активность и/или повышенную стабильность в денатурирующих условиях.

а) Повышенная активность.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20 или варианты полипептидов PH20, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде PH20 и которые обладают повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с соответствующим полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены), например полипептидом PH20, приведенным в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или его вариантом, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. В частности, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 или варианты полипептидов PH20 обладают повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с соответствующим полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену, например, полипептидом PH20, приведенным в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72 и, в частности, полипептидом PH20, приведенным в SEQ ID NO: 3.

Модифицированный полипептид PH20 может обладать гиалуронидазной активностью, которая составляет по меньшей мере или примерно по меньшей мере или 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180,

200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000% от гиалуронидазной активности соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену (замены), например полипептида PH20, приведенного в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или его варианта, в тех же самых условиях. Например, гиалуронидазная активность повышена по меньшей мере или примерно по меньшей мере в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз или более.

В конкретных примерах модифицированные полипептиды PH20 содержат аминокислотную замену в одной или нескольких аминокислотных позициях, которые были идентифицированы как ассоциированные с повышенной гиалуронидазной активностью. Как описано в настоящем документе, такие позиции были идентифицированы с использованием мутагенеза и способов отбора или скрининга для идентификации позиций, которые приводят к повышенной гиалуронидазной активности. Полипептид PH20 также может содержать другие модификации, такие как другие аминокислотные замены, которые сами по себе не ассоциированы с повышенной активностью, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 обладает повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с PH20, не содержащим аминокислотную модификацию (модификации), такую как аминокислотная замена (замены). Предусмотренный в настоящем документе модифицированный полипептид PH20 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или больше аминокислотных замен. Также могут быть введены дополнительные модификации, такие как вставки или делеции. Аминокислотная замена может быть введена в полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его вариант, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, замена (замены) могут быть введены в полипептид PH20 человека, например в любой полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в его вариант.

Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 содержат аминокислотную замену в одной или нескольких аминокислотных позициях, соответствующих позициям 1, 12, 15, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 39, 46, 48, 52, 58, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 84, 86, 87, 92, 93, 94, 97, 118, 120, 127, 131, 135, 141, 142, 147, 148, 150, 151, 152, 155, 156, 163, 164, 165, 166, 169, 170, 174, 198, 206, 209, 212, 213, 215, 219, 233, 234, 236, 238, 247, 257, 259, 260, 261, 263, 269, 271, 272, 276, 277, 278, 282, 291, 293, 305, 308, 309, 310, 313, 315, 317, 318, 320, 324, 325, 326, 328, 347, 353, 359, 371, 377, 380, 389, 392, 395, 399, 405, 407, 409, 410, 418, 419, 421, 425, 431, 433, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 445, 446 или 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, замены в аминокислотных позициях могут представлять собой замены в позициях, соответствующие замене лейцина (L) в позиции 1 (L1), V12, L15, F24, L26, G27, F29, D30, E31, P32, L33, L37, S39, I46, A48, G52, V58, Y63, I67, D68, S69, I70, T71, G72, V73, T74, V75, S84, G86, D87, A92, K93, K94, T97, T118, A120, D127, N131, E135, N141, V142, T147, E148, T150, E151, K152, Q155, E156, D163, F164, L165, V166, I169, K170, L174, G198, V206, K209, D212, D213, S215, N219, Q233, Q234, P236, A238, V247, P257, A259, K260, S261, L263, T269, I271, V272, Q276, V277, L278, S282, G291, T293, G305, S308, I309, M310, M313, S315, L317, L318, D320, E324, T325, I326, N328, Q347, I353, S359, A371, G377, F380, E389, E392, S395, Y399, T405, S407, K409, E410, D418, A419, D421, A425, D431, F433, P436, P437, M438, E439, T440, E441, E442, P443, I445, F446 или Y447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Примерами таких модифицированных полипептидов PH20 являются полипептиды, которые обладают активностью, которая превышает активность соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену, по меньшей мере, в 1,5 раза или больше.

Примеры предусмотренных в настоящем документе аминокислотных замен в модифицированных полипептидах PH20 включают, но не ограничиваются ими, замену на гистидин (H) в позиции, соответствующей позиции 1; Q в позиции, соответствующей позиции 1; E в позиции, соответствующей позиции 12; T в позиции, соответствующей позиции 12; V в позиции, соответствующей позиции 15; E в позиции, соответствующей позиции 24; H в позиции, соответствующей позиции 24; E в позиции, соответствующей позиции 26; K в позиции, соответствующей позиции 26; K в позиции, соответствующей позиции 27; R в позиции, соответствующей позиции 27; E в позиции, соответствующей позиции 29; I в позиции, соответствующей позиции 29; L в позиции, соответствующей позиции 29; M в позиции, соответствующей позиции 29; P в позиции, соответствующей позиции 29; S в позиции, соответствующей позиции 29; V в позиции, соответствующей позиции 29; G в позиции, соответствующей позиции 30; H в позиции, соответствующей позиции 30; K в позиции, соответствующей позиции 30; M в позиции, соответствующей позиции 30; R в позиции, соответствующей позиции 30; S в позиции, соответствующей позиции 30; A в позиции, соответствующей позиции 31; C в позиции, соответствующей позиции 31; H в позиции, соответствующей позиции 31; I в позиции, соответствующей позиции 31; K в позиции, соответствующей позиции 31; L в позиции, соответствующей позиции 31; P в позиции, соответствующей позиции 31; R в

обладает, по меньшей мере, повышенной в 1,5 раза гиалуронидазной активностью.

В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 содержат одну или несколько аминокислотных замен в позиции (позициях), соответствующих позиции (позициям) 24, 29, 31, 48, 58, 69, 70, 75, 84, 97, 165, 166, 271, 278, 317, 320, 325 и/или 326 со ссылкой на позиции, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, примеры аминокислотных замен включают, но не ограничиваются ими, замену на Е в позиции, соответствующей позиции 24; Е в позиции, соответствующей позиции 29; V в позиции, соответствующей позиции 31; N в позиции, соответствующей позиции 48; K в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; А в позиции, соответствующей позиции 69; F в позиции, соответствующей позиции 69; G в позиции, соответствующей позиции 69; P в позиции, соответствующей позиции 69; R в позиции, соответствующей позиции 69; А в позиции, соответствующей позиции 70; F в позиции, соответствующей позиции 70; G в позиции, соответствующей позиции 70; H в позиции, соответствующей позиции 70; H в позиции, соответствующей позиции 70; N в позиции, соответствующей позиции 70; R в позиции, соответствующей позиции 70; T в позиции, соответствующей позиции 70; V в позиции, соответствующей позиции 70; L в позиции, соответствующей позиции 75; T в позиции, соответствующей позиции 75; G в позиции, соответствующей позиции 84; G в позиции, соответствующей позиции 97; D в позиции, соответствующей позиции 165; L в позиции, соответствующей позиции 166; R в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 271; H в позиции, соответствующей позиции 278; R в позиции, соответствующей позиции 278; K в позиции, соответствующей позиции 317; K в позиции, соответствующей позиции 320; E в позиции, соответствующей позиции 325, на G в позиции, соответствующей позиции 325; K в позиции, соответствующей позиции 325; N в позиции, соответствующей позиции 325; Q в позиции, соответствующей позиции 325; V в позиции, соответствующей позиции 326; где каждая замена приведена со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Модифицированные полипептиды PH20 могут содержать любую одну или несколько из указанных аминокислотных замен, в любой комбинации, а также содержать или не содержать дополнительные модификации, при условии, что полипептид PH20 обладает гиалуронидазной активностью, такой как повышенная гиалуронидазная активность по сравнению с полипептидом PH20, не содержащим модификацию (модификации), например, по меньшей мере, повышенной в 2,0-раза гиалуронидазной активностью.

Примерами модифицированных полипептидов PH20, которые обладают повышенной активностью по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20 (например, приведенным в SEQ ID NO: 3) являются любые полипептиды PH20, имеющие последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 73, 78, 86, 89, 91, 95, 96, 99, 100, 105, 106, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 123-126, 128-136, 139-141, 149, 154, 155, 159, 164, 165, 167, 173, 178, 181, 191-193, 195-197, 199-205, 207-221, 225, 226, 228, 229, 231, 233, 237-239, 242, 247-254, 256, 257, 267, 269, 270, 277, 283, 293, 295, 296, 298, 300, 303, 308, 316, 318, 321, 322, 324, 325, 330, 334, 335, 338-340, 344, 348, 355, 367, 369, 371, 377, 384-388, 394, 398, 399, 401, 406-408, 410, 412, 414, 416, 419, 421-426, 428, 430, 431, 435, 448, 455, 456, 459, 462, 463, 465, 469, 478-480, 482, 484, 490, 493, 497, 501, 503, 505, 506-508, 510-512, 514, 518, 522, 523, 527, 531, 533, 537-543, 545, 551, 558, 559, 561, 563-566, 569, 572, 574, 576, 579, 581-583, 585, 587, 588, 594, 596, 602, 605, 606, 609, 613, 618-620, 624-634, 637, 640-644, 647, 648, 652, 657, 675, 695, 698, 699, 700, 712, 717, 725, 731, 732, 734, 738, 742, 746, 748-750, 757, 760, 762-765, 768-773, 775, 779, 782, 783, 786-789, 794-797, 799-801, 807, 814, 816, 819, 822, 825, 826, 830, 836, 838, 844, 847, 851, 853, или имеющие последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 73, 78, 86, 89, 91, 95, 96, 99, 100, 105, 106, 108, 109, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 123-126, 128-136, 139-141, 149, 154, 155, 159, 164, 165, 167, 173, 178, 181, 191-193, 195-197, 199-205, 207-221, 225, 226, 228, 229, 231, 233, 237-239, 242, 247-254, 256, 257, 267, 269, 270, 277, 283, 293, 295, 296, 298, 300, 303, 308, 316, 318, 321, 322, 324, 325, 330, 334, 335, 338-340, 344, 348, 355, 367, 369, 371, 377, 384-388, 394, 398, 399, 401, 406-408, 410, 412, 414, 416, 419, 421-426, 428, 430, 431, 435, 448, 455, 456, 459, 462, 463, 465, 469, 478-480, 482, 484, 490, 493, 497, 501, 503, 505, 506-508, 510-512, 514, 518, 522, 523, 527, 531, 533, 537-543, 545, 551, 558, 559, 561, 563-566, 569, 572, 574, 576, 579, 581-583, 585, 587, 588, 594, 596, 602, 605, 606, 609, 613, 618-620, 624-634, 637, 640-644, 647, 648, 652, 657, 675, 695, 698, 699, 700, 712, 717, 725, 731, 732, 734, 738, 742, 746, 748-750, 757, 760, 762-765, 768-773, 775, 779, 782, 783, 786-789, 794-797, 799-801, 807, 814, 816, 819, 822, 825, 826, 830, 836, 838, 844, 847, 851, 853, и содержит аминокислотную замену, обладает повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с соответствующим не модифицированным полипептидом.

b) Повышенная стабильность.

В настоящем документе предусмотрены полипептиды, обладающие повышенной стабильностью. В частности, полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью *in vivo* и/или *in vitro*. Например, полипептиды PH20 могут обладать повышенной стабильностью в денатурирующих условиях. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью, демонстрируют, среди других параметров, повышенную устойчивость к денатурирую-

щим условиям, включая, но не ограничиваясь этим, повышенную устойчивость к денатурирующему условию, вызванному температурой (например, повышенная температура, например, нагревание), перемешиванием или отсутствием или низким содержанием соли, и/или присутствием эксципиентов. Примеры эксципиентов включают, но не ограничиваются ими, антиадгезионные агенты, связующие агенты, агенты для покрытия оболочкой, наполнители и разбавители, вкусоароматические агенты, красители, смазывающие вещества, глиданты, консерванты, детергенты, сорбенты или подсластители. Например, различные эксципиенты, такие как консерванты, действуют как агенты, денатурирующие белок. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью белка, характеризуются пониженной агрегацией, пониженной преципитацией и/или повышенной активностью при воздействии денатурирующего условия по сравнению с соответствующим PH20, не содержащим аминокислотную замену. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной активностью по меньшей мере или по меньшей мере примерно или на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500% или более при воздействии денатурирующего условия по сравнению с активностью соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену, при воздействии того же самого денатурирующего условия.

Предусмотренные в настоящем документе полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью, представляют собой модифицированные полипептиды PH20 или варианты полипептидов PH20, содержащие аминокислотную замену, делецию или вставку, или другую модификацию. Как правило, предусмотренные в настоящем документе полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью, содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде PH20 по сравнению с соответствующим полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены), например, полипептидом PH20, приведенным в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или его вариантом, обладающим, по меньшей мере, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. В частности, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 или варианты полипептидов PH20 обладают повышенной стабильностью по сравнению с соответствующим полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену, например, полипептидом PH20, приведенным в любой из

SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72 и, в частности, полипептидом PH20, приведенным в SEQ ID NO: 3.

В конкретных примерах модифицированные полипептиды PH20 содержат аминокислотную замену в одной или нескольких позициях, которые идентифицировали как ассоциированные с повышенной стабильностью. Как описано в настоящем документе, такие позиции можно идентифицировать с использованием мутагенеза и способов отбора или скрининга для идентификации таких позиций, которые приводят к стабильности (например, повышенной активности) полипептида по сравнению с соответствующим PH20, не содержащим модификацию, при воздействии одного или нескольких денатурирующих условий. Полипептид PH20 также может содержать другие модификации, такие как другие аминокислотные замены, которые сами по себе не ассоциированы со стабильностью, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 обладает повышенной стабильностью при воздействии одного или нескольких денатурирующих условий по сравнению с PH20, не содержащим аминокислотную модификацию (модификации), такие как аминокислотная замена (замены), и обладает гиалуронидазной активностью. Предусмотренный в настоящем документе модифицированный полипептид PH20 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 или более аминокислотных замен. Также могут быть введены дополнительные модификации, такие как вставки или делеции. Аминокислотная замена может быть введена в полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его вариант, обладающий по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, замены могут быть введены в полипептид PH20 человека, например в любой полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в его вариант.

Примерами предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов PH20 являются полипептиды PH20, которые обладают повышенной стабильностью при воздействии фенольных соединений, при воздействии высокой температуры (нагревания) и/или в отсутствие NaCl.

i) Фенофильные полипептиды.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью в присутствии фенольных соединений. Многодозовые лекарственные формы должны содержать противомикробные консерванты для защиты от микробного загрязнения. Для парентеральных лекарственных препаратов, в том числе для инсулина и других терапевтических агентов наиболее распространены консервантами являются фенольные соединения, такие как фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт и парабены, в том числе метилпарабен и пропилпарабен. Консерванты, как

правило, должны присутствовать в достаточных концентрациях, чтобы удовлетворять нормативным требованиям. Например, нормативные требования утверждают, что противомикробная эффективность лекарственной формы должна удовлетворять требованиям теста эффективности консерванта (PET) для целевых рынков. В настоящее время различные регулирующие ведомства имеют различные фармакопейные критерии для противомикробной эффективности фармацевтических препаратов, предназначенных для многократного дозирования. Требования PET фармакопеи США (USP) и европейской фармакопеи (EP) значительно отличаются, что налагает дополнительные ограничения на разработку многодозовых лекарственных форм. В табл. 4 приведены критерии USP и EP для инъекционных препаратов. Как правило, лекарственные формы, удовлетворяющие противомикробным требованиям EP (EPA или EPB), содержат больше консервантов, чем те лекарственные формы, которые удовлетворяют только противомикробным требованиям USP.

Таблица 4

Требования USP и EP к тесту на противомикробную эффективность

Требование	время	США	Европа	
		USP	EPB (Минимум)	EPA (предпочтительное)
Логарифмическое уменьшение количества бактериальных организмов*	6 ч			2
	24 ч		1	3
	7 дней	1.0	3	нет обнаружения
	14 дней	3.0	Нет увеличения	нет обнаружения
	28 дней	Нет увеличения	Нет увеличения	нет обнаружения
Логарифмическое уменьшение количества грибковых организмов*	7 дней	Нет увеличения		2
	14 дней	Нет увеличения	1	Нет увеличения
	28 дней	Нет увеличения	Нет увеличения	Нет увеличения

* уменьшение в единицах десятичного логарифма от первоначального измеренного инокулята; Нет увеличения: увеличение не более чем на 0,5 единицы десятичного логарифма по сравнению с предыдущим измеренным значением.

Противомикробные консерванты могут взаимодействовать с белками, что приводит к агрегации и отрицательно влияет на стабильность. Таким образом, несмотря на то, что консерванты являются необходимым компонентом, они представляют собой большую проблему при разработке стабильных многодозовых лекарственных форм белков, потому что они, как правило, вызывают агрегацию белка в водном растворе. В частности, повышенное или высокое количество консервантов может оказывать неблагоприятное воздействие на стабильность белка, в том числе может влиять на физическую стабильность (агрегация или преципитация), что может оказывать воздействие на активность белка. Например, чтобы удовлетворить требованиям EP для эффективности консерванта, может потребоваться относительно высокое содержание фенольных соединений, таких как фенол или м-крезол, которое может влиять на стабильность белковой лекарственной формы. Например, было показано, что консерванты, такие как фенол, м-крезол и бензиловый спирт, вызывают агрегацию гормона роста человека (Maa and Hsu (1996) Int. J. Pharm. 140:155-168), рекомбинантного рецептора интерлейкина-1 (ReMMele (1998) Pharm. Res. 15:200-208), инсулиноподобного фактора роста I человека (Fransson (1997) Pharm. Res. 14:606-612), rhIFN- γ (Lam (1997) Pharm. Res. 14:725-729) и цитохрома c (Singh et al. (2011) J. Pharm ScL, 100:1679-89). Дестабилизирующий эффект, который консерванты оказывают на белки в растворе, являлся лимитирующим фактором для разработки многодозовых лекарственных форм, и в настоящее время большинство лекарственных форм терапевтических белков разработаны только для однократного применения.

Гиалуронидаза PH20, такая как гHuPH20, быстро теряет активность в присутствии консервантов, вероятно, вследствие разворачивания белка и последующего образования агрегатов. Например, как показано в примерах в настоящем документе, консерванты снижают энзиматическую активность PH20, в особенности, при повышенных температурах (см., также предварительную заявку США № 61/520962 и заявки США №№ 13/507263 и 13/507262). Например, после инкубации с 0,4% м-крезолом в течение 4 ч PH20 (например, гHuPH20) сохраняет только примерно 10% своей активности (см., например, пример 5). При инкубации в присутствии 0,1% фенола и 0,15 или 0,315% м-крезола в течение 6 дней при 37°C PH20

(например, гНuPH20) сохраняет примерно от 0 до 15% активности в зависимости от присутствия других эксципиентов или количества других эксципиентов в лекарственной форме (см., например, примеры 9 и 10). Например, присутствие высокой концентрации соли обычно повышает стабильность PH20. В частности, температура плавления PH20, такого как гНuPH20, значительно понижается при добавлении в лекарственную форму фенольных консервантов, таких как м-крезол. Например, температура разворачивания гНuPH20 понижается с 44 до 24°C. Более низкая температура разворачивания PH20 приводит к повышенной агрегации PH20, в особенности, при повышенных температурах, и снижению активности фермента. Дестабилизирующий эффект, вероятно, является следствием гидрофобной природы фенольных консервантов. Гидрофобность фенольных соединений может приводить к взаимодействию с гНuPH20 посредством неспецифического связывания с белком, что, в конечном счете, нарушает структурную целостность гНuPH20. Это приводит к значительной потере энзиматической активности гНuPH20 в присутствии консервантов.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью в присутствии фенольных консервантов, проявляют более чем 15% энзиматической активности в присутствии по меньшей мере одного фенольного консерванта в течение по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней, 3 недель, 4 недель или больше по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида PH20 в отсутствие консерванта в течение того же самого периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта). В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большей энзиматической активностью в присутствии фенольного консерванта по сравнению с отсутствием консерванта. Например, фенольный консервант может представлять собой фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт и/или парабены, в том числе метилпарабен или пропилпарабен.

В конкретных примерах повышенная стабильность в присутствии консерванта проявляется при температуре между или примерно между 0 и 40°C, например между или примерно между 2 и 6°C, 24 и 32°C или 35 и 40°C и обычно при или примерно при 4 или 5°C, 30 или 37°C. Понятно, что поскольку высокая температура также оказывает дестабилизирующий эффект на активность PH20 (см. ниже), процент энзиматической активности предусмотренного в настоящем документе модифицированного полипептида PH20 в присутствии консерванта выше при более низких температурах, чем при более высоких температурах.

Обычно предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью и указанной энзиматической активностью в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов в образце композиции. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов, так что количество бактериальных организмов уменьшается по меньшей мере в 10 раз через 7 дней после инокуляции. В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов, так что при тестировании в тесте на противомикробную эффективность консерванта (APET) после инокуляции композиции микробным инокулятом обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 10 раз через 7 дней после инокуляции, обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 1000 раз через 14 дней после инокуляции, обеспечивается, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции и обеспечивается, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 7 дней после инокуляции. В других примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов, так что при тестировании в тесте на противомикробную эффективность консерванта (APET) после инокуляции композиции микробным инокулятом обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 10 раз через 24 ч после инокуляции, обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 1000 раз через 7 дней после инокуляции, обеспечивается, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции и обеспечивается уменьшение количества грибковых организмов по меньшей мере в 10 раз через 14 дней после инокуляции и обеспечивается, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 28 дней после инокуляции. В еще одном примере предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 обладают повышенной стабильностью в присутствии эффективного против микроорганизмов количества консерванта, которое убивает или ингибирует размножение микроорганизмов, так что при тестировании в тесте на противомикробную эффективность консерванта (APET) после

инокуляции композиции микробным инокулятом обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 100 раз через 6 ч после инокуляции, обеспечивается уменьшение количества бактериальных организмов по меньшей мере в 1000 раз через 24 ч после инокуляции, обеспечивается отсутствие обнаружения бактериальных организмов через 28 дней после инокуляции композиции микробным инокулятом, обеспечивается уменьшение количества грибковых организмов по меньшей мере в 100 раз через 7 дней после инокуляции и обеспечивается, по меньшей мере, отсутствие дальнейшего увеличения количества грибковых организмов через 28 дней после инокуляции.

Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 обладают повышенной стабильностью и указанной выше энзиматической активностью в присутствии одного или нескольких фенольных консервантов в общем количестве, выраженном в виде процентной (%) концентрации по массе (масса/объем), составляющей или составляющей между 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4% включительно.

Обычно предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 обладают повышенной стабильностью в присутствии м-крезола и/или фенола. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 обладают повышенной стабильностью в лекарственной форме, содержащей модифицированный полипептид РН20, в присутствии м-крезола в количестве, выраженном в виде % концентрации по массе (масса/объем), между или примерно между 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4%. В других примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 обладают повышенной стабильностью в лекарственной форме, содержащей модифицированный полипептид РН20, в присутствии фенола в количестве, выраженном в виде % концентрации по массе (масса/объем), между или примерно между 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4%. В других примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 обладают повышенной стабильностью в лекарственной форме, содержащей модифицированный полипептид РН20, в присутствии фенола и м-крезола в количестве, выраженном в виде % концентрации по массе (масса/объем), между или примерно между 0,05 и 0,25% фенола и между или примерно между 0,05 и 0,3% м-крезола, между или примерно между 0,10 и 0,2% фенола и между или примерно между 0,6 и 0,18% м-крезола, между или примерно между 0,1 и 0,15% фенола и 0,8 и 0,15% м-крезола, между или примерно между 0,10 и 0,15% фенола и между или примерно между 0,06 и 0,09% м-крезола или между или примерно между 0,12 и 0,18% фенола и между или примерно между 0,14 и 0,22% м-крезола.

Например, модифицированные полипептиды РН20 проявляют более чем 15%, например по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую энзиматическую активность в присутствии, по меньшей мере, между примерно или между 0,3 и 0,4% включительно м-крезола и/или фенола в течение по меньшей мере 4 ч при 37°C по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение того же самого периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта). Например, модифицированные полипептиды РН20 проявляют более чем 15%, например по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую энзиматическую активность в присутствии примерно 0,4% м-крезола или 0,4% м-крезола в течение по меньшей мере 4 ч при 37°C по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение того же периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта). Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 также проявляют более чем 15%, например по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую энзиматическую активность в присутствии, по меньшей мере, между примерно или между 0,2 и 0,4% включительно м-крезола и/или фенола в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней при 37°C по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение того же периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта). Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 проявляют более чем 15%, например по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую энзиматическую активность в присутствии примерно 0,10% фенола или 0,10% фенола и примерно 0,15% м-крезола или 0,15% м-крезола в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней при 37°C по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение того же периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта). В других примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 проявляют более чем 15%, например по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или большую энзиматическую активность в присутствии примерно 0,315% м-крезола или 0,315% м-крезола в течение по меньшей мере 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней, обычно в течение по меньшей мере 6 дней при 37°C по сравнению с энзиматической активностью модифицированного полипептида РН20 в отсутствие консерванта в течение того же периода времени и при одинаковых условиях (за исключением присутствия консерванта).

Например, такие предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью к фенольным соединениям, содержат аминокислотную замену в одной или нескольких аминокислотных позициях, соответствующих позициям 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 219, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 или 445 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, аминокислотные замены могут представлять собой замены в позициях, соответствующие замене (P) в позиции 10 (P10), V12, A20, S22, L26, D34, S36, I46, G50, G52, V58, D68, I70, T74, K82, I83, S84, Q86, T97, D127, N131, Q138, V142, Q143, L144, V166, I169, L174, H193, K195, K196, F204, N205, V206, D213, N219, Q234, V237, A238, T240, E249, S261, A267, V277, K279, G291, I309, M310, K314, S315, L317, Q347, P367, E375, K376, Y399, S401, S407, D416, A419, D421, D431, F433, E439, T440, P443 или I445 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Примеры аминокислотных замен в предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидах PH20 включают, но не ограничиваются ими, замену на глицин (G) в позиции, соответствующей позиции 10; K в позиции, соответствующей позиции 12; S в позиции, соответствующей позиции 20; T в позиции, соответствующей позиции 22; M в позиции, соответствующей позиции 26; W в позиции, соответствующей позиции 34; N в позиции, соответствующей позиции 36; L в позиции, соответствующей позиции 46; M в позиции, соответствующей позиции 50; T в позиции, соответствующей позиции 52; S в позиции, соответствующей позиции 52; C в позиции, соответствующей позиции 58; K в позиции, соответствующей позиции 58; R в позиции, соответствующей позиции 58; N в позиции, соответствующей позиции 58; Y в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 58; H в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 68; V в позиции, соответствующей позиции 70; E в позиции, соответствующей позиции 74; L в позиции, соответствующей позиции 82; N в позиции, соответствующей позиции 82; V в позиции, соответствующей позиции 83; Q в позиции, соответствующей позиции 83; S в позиции, соответствующей позиции 83; G в позиции, соответствующей позиции 83; N в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; K в позиции, соответствующей позиции 86; E в позиции, соответствующей позиции 97; L в позиции, соответствующей позиции 97; R в позиции, соответствующей позиции 127; R в позиции, соответствующей позиции 131; L в позиции, соответствующей позиции 138; K в позиции, соответствующей позиции 142; N в позиции, соответствующей позиции 142; P в позиции, соответствующей позиции 142; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; G в позиции, соответствующей позиции 143; K в позиции, соответствующей позиции 143; T в позиции, соответствующей позиции 144; Q в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 169; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; N в позиции, соответствующей позиции 195; E в позиции, соответствующей позиции 196; R в позиции, соответствующей позиции 196; P в позиции, соответствующей позиции 204; A в позиции, соответствующей позиции 205; E в позиции, соответствующей позиции 205; I в позиции, соответствующей позиции 206; A в позиции, соответствующей позиции 213; I в позиции, соответствующей позиции 219; M в позиции, соответствующей позиции 234; T в позиции, соответствующей позиции 237; H в позиции, соответствующей позиции 238; Q в позиции, соответствующей позиции 240; V в позиции, соответствующей позиции 249; A в позиции, соответствующей позиции 261; K в позиции, соответствующей позиции 261; T в позиции, соответствующей позиции 267; K в позиции, соответствующей позиции 277; H в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 291; E в позиции, соответствующей позиции 309; Q в позиции, соответствующей позиции 310; Y в позиции, соответствующей позиции 314; Y в позиции, соответствующей позиции 315; N в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; D в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции, соответствующей позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 375; R в позиции, соответствующей позиции 376; V в позиции, соответствующей позиции 399; E в позиции, соответствующей позиции 401; A в позиции, соответствующей позиции 407; L в позиции, соответствующей позиции 416; K в позиции, соответствующей позиции 419; H в позиции, соответствующей позиции 421; E в позиции, соответствующей позиции 431; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; C в позиции, соответствующей позиции 439; P в позиции, соответствующей позиции 440; G в позиции, соответствующей позиции 443; N в позиции, соответствующей позиции 445, где каждая замена приведена со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Аминокислотная замена (замены) могут быть введены в полипептид PH20, такой как полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его вариант, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, замена (замены) могут быть введены в полипептид PH20 человека, например в любой полипептид PH20, приведенный в

любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в его вариант.

Примерами модифицированных полипептидов PH20, обладающих повышенной стабильностью к фенольным соединениям по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20 (например, приведенным в SEQ ID NO: 3), являются любые полипептиды PH20, имеющие последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 176, 175, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 194, 221, 240, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 426, 430, 434, 436, 443, 444, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 467, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 или 837, или имеющие последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 176, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 194, 221, 240, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 426, 430, 434, 436, 443, 444, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 467, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 или 837 и содержит аминокислотную замену, обладает гиалуронидазной активностью и обладает повышенной стабильностью в присутствии фенольных соединений по сравнению с соответствующим не модифицированным полипептидом.

В частности, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену на Р в позиции, соответствующей аминокислотному остатку 204 со ссылкой на SEQ ID NO: 3. Как правило, модифицированный полипептид PH20 представляет собой полипептид человека. Например, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену F204P в последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 69, 72 или 32-66, или в последовательности аминокислот, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 69, 72 или 32-66, при условии, что модифицированный полипептид содержит аминокислотную замену, соответствующую F204P. В других случаях модифицированный полипептид PH20 представляет собой не человеческий полипептид. Например, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену F204P в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 857, 859, 861 или 870, или в последовательности аминокислот, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 10, 12, 14, 857, 859, 861 или 870, при условии, что модифицированный полипептид содержит аминокислотную замену, соответствующую F204P. В другом примере в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену F205P в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 24, или Y204P в SEQ ID NO: 31, или в последовательности, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 24 или 31. Примером такого модифицированного полипептида PH20 является полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 449, или имеющий последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 449 и содержит аминокислотную замену F204P, обладает повышенной гиалуронидазной активностью и обладает повышенной стабильностью к фенольным соединениям по сравнению с соответствующим не модифицированным полипептидом (например, SEQ ID NO: 3). В любом из приведенных выше примеров модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену на Р в позиции, соответствующей аминокислотному остатку 204 со ссылкой на SEQ ID NO: 3, не имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 15-22, 28 или 29.

В другом примере в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену в позиции, соответствующей аминокислотному остатку 58 со ссылкой на SEQ ID NO: 3. Примерами аминокислотных замен являются замена на лизин (K) или на аргинин (R) в позиции, соответствующей аминокислотному остатку 58 со ссылкой на SEQ ID NO: 3. Как правило, модифицированный полипептид PH20 представляет собой полипептид человека. Например, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену V58K или V58R в последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 69, 72 или 32-66, или в последовательности аминокислот, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 69, 72 или 32-66. В других случаях модифицированный полипептид PH20 представляет собой не человеческий полипептид. Например, в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену V58K или V58R в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 20, 22, 24, 29, 857, 859, 861 или 870, или в последовательности, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 10, 12, 14, 20, 22, 24, 29, 857, 859, 861 или

870. В другом примере в настоящем документе предусмотрен модифицированный полипептид RH20, содержащий аминокислотную замену A58R в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 16 или 31, или в последовательности, которая обладает по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 16 или 31. Примером такого модифицированного полипептида RH20 является полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 182, или имеющий последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 182, которая содержит аминокислотную замену V58R и обладает повышенной гиалуронидазной активностью и обладает повышенной стабильностью в присутствии фенольных соединений по сравнению с соответствующим не модифицированным полипептидом (например, SEQ ID NO: 3).

ii) Термофильные полипептиды.

При повышенных температурах гиалуронидазы RH20 могут терять активность. В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, обладающие повышенной стабильностью при повышенных температурах между или примерно между 30 и 45°C включительно, таких как между или примерно между 35 и 42°C, в частности, при 37°C или примерно при 37°C. Например, в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, являющиеся стабильными при повышенных температурах более 32°C, например от 35 до 45°C, от 37 до 42°C и, в частности, при 37 или примерно при 37°C в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 12 ч, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней или по меньшей мере 7 дней. Модифицированные полипептиды RH20, обладающие стабильностью при повышенных температурах, могут использоваться в таких применениях, где температура повышена, может колебаться или может повышаться. Это может иметь место, например, в способах введения с использованием помп или других устройств для непрерывной инфузии.

В частности, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, обладающие стабильностью при повышенных температурах, обладают повышенной гиалуронидазной активностью при повышенной температуре по сравнению с соответствующим полипептидом RH20, не содержащим модификацию, например аминокислотную замену. Полипептиды RH20 могут обладать повышенной гиалуронидазной активностью при инкубации при повышенных температурах более 32°C, например от 35 до 45°C или от 37 до 42°C, в частности при 37°C или примерно 37°C в течение по меньшей мере 4, 5, 6, 12 ч, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней или по меньшей мере 7 дней по сравнению с соответствующим полипептидом RH20, не содержащим модификацию, который инкубировали при тех же самых условиях. Например, гиалуронидазная активность может быть повышенной по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% или больше по сравнению с соответствующим полипептидом RH20, не содержащим модификацию, который инкубировали при тех же самых условиях. Например, гиалуронидазная активность может быть повышенной по меньшей мере в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или больше по сравнению с соответствующим полипептидом RH20, не содержащим модификацию, который инкубировали при тех же самых условиях.

В других примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, обладающие стабильностью при повышенных температурах, сохраняют гиалуронидазную активность при повышенных температурах по сравнению с активностью модифицированного полипептида RH20, который инкубировали при не повышенных температурах в тех же самых условиях (за исключением различий в температуре). Например, модифицированные полипептиды RH20 обладают больше чем или примерно 50%, например по меньшей мере или более 55, 60, 65, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности при повышенных температурах более 32°C, таких как от 35 до 45°C или от 37 до 42°C, в частности при температуре или примерно при температуре 37°C по сравнению с активностью RH20 при не повышенных температурах между или примерно между 2 и 8°C. В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, обладающие стабильностью при повышенных температурах, обладают повышенной активностью при повышенных температурах по сравнению с активностью модифицированного полипептида RH20, который инкубировали при не повышенных температурах в тех же самых условиях (за исключением различий в температуре). Например, модифицированные полипептиды RH20 обладают активностью, увеличенной более чем или примерно на 10%, например более чем или по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% или большей активностью при повышенных температурах более 32°C, например от 35 до 45°C или от 37 до 42°C, в частности при температуре или примерно при температуре 37°C, по сравнению с активностью RH20 при не повышенных температурах между или примерно между 2 и 8°C. Например, модифицированные полипептиды RH20 обладают более чем или по меньшей мере примерно в 1,1 раз большей гиалуронидазной активностью, например более чем или по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз большей гиалуронидазной активностью, или большей активностью при повышенных температурах более 32°C, например от 35 до 45°C или от 37 до 42°C, в частности при температуре или примерно при температуре 37°C, по сравнению с активностью RH20 при не повышенных температурах между или примерно между 2 и 8°C.

Например, такие предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, обладающие повышенной стабильностью при повышенных температурах, содержат аминокислотную замену в одной или нескольких аминокислотных позициях, соответствующих позициям 1, 11, 12, 14, 20, 26, 29, 34, 50, 58, 70, 82, 83, 84, 86, 87, 140, 142, 143, 147, 152, 166, 167, 172, 174, 178, 193, 195, 206, 212, 213, 219, 233, 237, 240, 267, 277, 291, 292, 309, 313, 314, 317, 318, 347, 367, 368, 371, 374, 389, 392, 395, 396, 406, 419, 421, 439 или 443 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Например, аминокислотные замены могут представлять собой замены в позициях, соответствующие замене (L) в позиции 1 (L1), N11, V12, F14, A20, L26, F29, D34, G50, V58, I70, K82, I83, S84, Q86, D87, Q140, V142, Q143, T147, K152, V166, E167, G172, L174, N178, H193, K195, V206, D212, D213, N219, Q233, V237, T240, A267, V277, G291, E292, I309, M313, K314, L317, L318, Q347, P367, D368, A371, L374, E389, E392, S395, E396, L406, A419, D421, E439 или P443, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3. Полученный модифицированный полипептид PH20 обладает повышенной стабильностью при повышенных температурах более 32°C, таких как от 35 до 45°C, от 37 до 42°C и, в частности, при температуре или примерно при температуре 37°C в течение по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 12 ч, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней или дольше.

Примеры аминокислотных замен в предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидах PH20 включают, но не ограничиваются ими, замену на R в позиции, соответствующей позиции 1; S в позиции, соответствующей позиции 11; I в позиции, соответствующей позиции 12; V в позиции, соответствующей позиции 14; S в позиции, соответствующей позиции 20; M в позиции, соответствующей позиции 26; на R в позиции, соответствующей позиции 29; W в позиции, соответствующей позиции 34; M в позиции, соответствующей позиции 50; K в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; Q в позиции, соответствующей позиции 58; V в позиции, соответствующей позиции 70; L в позиции, соответствующей позиции 82; Q в позиции, соответствующей позиции 83; R в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; S в позиции, соответствующей позиции 87; K в позиции, соответствующей позиции 140; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; K в позиции, соответствующей позиции 143; S в позиции, соответствующей позиции 147; T в позиции, соответствующей позиции 152; T в позиции, соответствующей позиции 166; D в позиции, соответствующей позиции 167; A в позиции, соответствующей позиции 172; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; R в позиции, соответствующей позиции 178; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; I в позиции, соответствующей позиции 206; S в позиции, соответствующей позиции 212; A в позиции, соответствующей позиции 213; I в позиции, соответствующей позиции 219; G в позиции, соответствующей позиции 233; T в позиции, соответствующей позиции 237; A в позиции, соответствующей позиции 240; Q в позиции, соответствующей позиции 240; T в позиции, соответствующей позиции 267; E в позиции, соответствующей позиции 277; S в позиции, соответствующей позиции 291; H в позиции, соответствующей позиции 292; V в позиции, соответствующей позиции 292; S в позиции, соответствующей позиции 309; H в позиции, соответствующей позиции 313; S в позиции, соответствующей позиции 314; I в позиции, соответствующей позиции 317; T в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; R в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции, соответствующей позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 368; S в позиции, соответствующей позиции 371; P в позиции, соответствующей позиции 374; A в позиции, соответствующей позиции 389; V в позиции, соответствующей позиции 392; A в позиции, соответствующей позиции 395; H в позиции, соответствующей позиции 396; N в позиции, соответствующей позиции 406; H в позиции, соответствующей позиции 419; K в позиции, соответствующей позиции 419; R в позиции, соответствующей позиции 421; S в позиции, соответствующей позиции 421; A в позиции, соответствующей позиции 439; C в позиции, соответствующей позиции 439; или G в позиции, соответствующей позиции 443, где каждая замена приведена со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

Аминокислотная замена (замены) могут быть введены в полипептид PH20, такой как полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его вариант, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним. Например, замена (замены) могут быть введены в полипептид PH20 человека, например в любой полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в его вариант.

Примерами модифицированных полипептидов PH20, обладающих повышенной стабильностью к фенольным соединениям по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20 (например, приведенным в SEQ ID NO: 3), являются любые модифицированные полипептиды PH20, имеющие последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 79, 85, 87, 90, 93, 101, 114, 144, 171, 178, 181, 221, 259, 262, 269, 270, 282, 343, 356, 357, 359, 368, 395, 426, 429, 432, 434, 436, 441, 443, 444, 454, 460, 461, 467, 477, 487, 491, 492, 509, 525, 550, 554, 557, 584, 593, 599, 605, 611, 612, 617, 647, 658, 667, 676, 679, 709, 720, 723, 727, 740, 761, 763, 772, 773, 808, 809 или 829, или имеющие последовательность

аминокислот, которая обладает по меньшей мере 68, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 79, 85, 87, 90, 93, 101, 114, 144, 171, 178, 181, 221, 259, 262, 269, 270, 282, 343, 356, 357, 359, 368, 395, 426, 429, 432, 434, 436, 441, 443, 444, 454, 460, 461, 467, 477, 487, 491, 492, 509, 525, 550, 554, 557, 584, 593, 599, 605, 611, 612, 617, 647, 658, 667, 676, 679, 709, 720, 723, 727, 740, 761, 763, 772, 773, 808, 809 или 829 и содержит аминокислотную замену, обладает гиалуронидазной активностью и обладает стабильностью при повышенных температурах по сравнению с соответствующим не модифицированным полипептидом.

iii) Отсутствие соли.

RH20 денатурирует при низкой концентрации соли или в отсутствии соли. Таким образом, для поддержания стабильности RH20 требует высокой концентрации соли между или примерно между 140 и 200 мМ. Другие терапевтические агенты, например инсулин, обладают пониженной растворимостью и увеличенной кристаллизацией/агрегацией в присутствии высокой концентрации соли. Таким образом, требование высокой концентрации соли для RH20 может влиять на растворимость и/или активность терапевтического агента в совместной лекарственной форме, тогда как низкое содержание соли может снизить активность RH20. Это может создать проблемы для получения совместных лекарственных форм RH20.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, обладающие повышенной стабильностью в присутствии низких концентраций соли (например, NaCl) меньше чем 100 мМ, например меньше чем 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 мМ или меньше. Обычно предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20 обладают стабильностью в присутствии низких концентраций соли, например низких концентраций NaCl между или примерно между 10 и 100 мМ NaCl, например между или примерно между 15 и 80 мМ NaCl. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, обладающие стабильностью при низких концентрациях соли, таких как низкие концентрации NaCl (т.е. меньше чем 100 мМ или меньше), обладают повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с соответствующим RH20, не содержащим модификацию (модификации) (например, аминокислотные замены). Например, модифицированные полипептиды RH20 обладают активностью, увеличенной более чем или примерно на 10%, например более чем или по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% или большей активностью при низких концентрациях соли, таких как низкие концентрации NaCl (т.е. меньше чем 100 мМ), по сравнению с активностью соответствующего RH20, не содержащего аминокислотную модификацию (модификации) (например, аминокислотную замену (замены)) при одинаковых условиях. Например, модифицированные полипептиды RH20 обладают более чем или по меньшей мере примерно в 1,1 раз большей гиалуронидазной активностью, например более чем или по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз большей гиалуронидазной активностью, или большей активностью при низких концентрациях соли NaCl меньше чем 100 мМ по сравнению с активностью соответствующего RH20, не содержащего аминокислотную модификацию (модификации) (например, аминокислотную замену (замены)) при одинаковых условиях.

2. Неактивные мутанты.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды RH20, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде RH20 и являющиеся неактивными, при этом полипептиды не обладают гиалуронидазной активностью или обладают низкой или уменьшенной гиалуронидазной активностью. Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, являющиеся неактивными, обычно обладают меньше чем 20%, например меньше чем 10% гиалуронидазной активности полипептида RH20 дикого типа или полипептида RH20 сравнения, такого как полипептид, приведенный в SEQ ID NO: 3 или 7. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды RH20, являющиеся неактивными, обладают меньше чем 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05% или меньше от гиалуронидазной активности полипептида RH20 дикого типа или полипептида RH20 сравнения, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию (например, аминокислотную замену), например полипептид, приведенный в SEQ ID NO: 3 или 7.

Например, в настоящем документе предусмотрены полипептиды RH20, являющиеся неактивными и модифицированными, например, которые имеют аминокислотную замену по сравнению с полипептидом RH20 дикого типа или сравнения. Например, предусмотренный в настоящем документе модифицированный полипептид RH20, являющийся неактивным, содержит одну или несколько аминокислотных замен в позиции (позициях), соответствующей позиции 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215,

216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 331, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 434, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 или 447 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 является неактивным и обладает менее чем 20% и обычно менее чем 10% от гиалуронидазной активности соответствующего полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену. Как правило, аминокислотный остаток, который модифицирован (например, замещен) в позиции, соответствующей любой из приведенных выше позиций, в полипептиде PH20, является идентичным остатком, консервативным остатком или полуконсервативным аминокислотным остатком по отношению к аминокислотному остатку, приведенному в SEQ ID NO: 3. Примеры аминокислотных замен в любых приведенных выше соответствующих позициях приведены в табл. 5. Указание на соответствующую позицию в табл. 5 дана со ссылкой на позиции, приведенные в SEQ ID NO: 3. Понятно, что замены могут быть сделаны в соответствующей позиции в другом полипептиде PH20, где соответствующую позицию определяют путем выравнивания с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 (см., например, фиг. 1 и 2), при этом соответствующая позиция представляет собой выравненную позицию. Аминокислотная замена (замены) могут быть сделаны в соответствующей позиции в полипептиде PH20, таком как полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6-66, 68-72, 856-861, 869 или 870, или в его варианте, который обладает по меньшей мере 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с ним, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 является неактивным. Например, замена (замены) могут быть сделаны в соответствующей позиции в полипептиде PH20 человека, например, в любом полипептиде PH20, приведенном в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или в его варианте. В частности, любая одна или несколько замен могут быть сделаны в SEQ ID NO: 3, при условии, что полученный модифицированный полипептид PH20 является неактивным и обладает менее чем 20%, и обычно менее чем 10% от гиалуронидазной активности полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 3.

Таблица 5

Неактивные мутанты

Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена	Соответствующая позиция	Замена
2	H K W Y	3	A G K P T V	4	D E F G L P W Y
5	D G I L M N P Q R T V W Y	6	E F T V Y	7	C D F G H I K L Q R S T W Y
8	D E G H N R S W	9	C D E G N P	10	F I L M Y

11	ACFILP TWY	12	GHW	13	EGILM V
14	AEGHK NPQW	15	EFGKN PQRSY	16	ACDEF GHKMP RSTY
17	DEGHI LNPQR STVWY	18	CDFGHI LMPQS TVY	19	ACFGH ILMPQ RSVWY
20	DEFHK LNPRT VY	21	ACDEG HILMRS TVW	22	CEGKP
23	AFLMN PRSTV	25	DEFGHI KLNPR STVY	27	C
33	CDHNV Y	34	ILNSTV	35	ADGPR S
36	CFVWY	37	CEGNS	38	EGKLN QRTW
39	CDFW	40	ADEGK NRSTV	41	Q
42	DEHIK LMPQR STV	43	AIEFGIK LQRV	44	ACFGH ILNQRS TWY
45	ADFGP W	46	PW	47	V
48	P	49	CDGHP	50	V
51	CFIMPT WY	52	CEFWY	53	ACDEG HLNPQ RSTWY
54	DEGPR Y	55	ADGHN PQRTV Y	56	ACEGH IKLPRS TVW
57	ADFGI MPQRV W	58	A	59	AEILM PRTVW Y
60	ADFGH ILNPQS TVY	61	AIEFGH NPQRT WY	62	ACDFI KLMPQ RSTVY
63	CGP	64	ACDEF GHIKLP QRSTV W	65	ACDGH IKNRST VWY
66	ACDEG IKLNPS TV	67	DEGPR TW	68	ACGILP VY
69	NT	70	Q	71	P
72	CFHIPV W	73	P	75	DGP
76	ACFGI KLPQR STVW	77	DELPQ RTV	78	ADIMPT TY

79	ADFGH KNPSW Y	80	ADEFGI KLMNR STVY	81	ACEGH LNPSV WY
82	YEK	84	Y	85	ACDEF GHNQS T
86	CP	87	P	88	ACEFGI KLMPR STVY
89	ADEGQ STWY	90	CG	91	DEFGH LT
92	EFHKP QRWY	94	GP	95	ACEFG HKLMP QSVWY
96	SVHPR STW	98	P	99	CEGINP VW
100	CEFGN PRSTW Y	101	ACFHK LMNQR ST	102	P
103	ADEFGH ILQRT VWY	104	FPW	105	CMN
106	ACDFH LMNPS WY	107	ACHKP QSVW	108	DEFKL MPQTV Y
109	CDELM RTW	110	FKLMP W	111	HIQ
112	CEGHL NPS	113	RV	114	ILPTV
115	ACDFG HIKLM RSVY	116	ACDEG HILNPQ SVW	117	DGIKN QRSVW
118	CDEGP RWY	119	AKILNP R	121	ACEFG HKLMP WY
122	ACEFIK QRSTV	123	ACDEH LMPQR STVY	124	CDEFN
125	CDGLN W	126	FHILNP Y	127	K
128	EP	129	ACDEG HLPQST VW	130	CDGHL NSTWY
131	P	132	P	133	DEFGH LMNPR TVW
134	ACDFG HKPQR SW	135	P	136	P
137	FGHNP RWY	138	V	139	P

143	CHPRS T	144	AEFIKP QSVY	145	TW
149	E	149	P	150	V
152	L	153	EFMPR TV	154	DEGPS WY
155	PY	156	P	157	ACDEG HIKLM PQRST V
158	DKPRY	159	WY	161	W
163	CP	164	ACDEG HNPQR	165	CHPT
166	D	167	V	168	ACDEF GKLPR SVWY
169	ADFGH KNPQS TY	170	CDEGM PWY	171	CDHMN RSWY
172	DEILPQ TVWY	173	DEGHIL MPSVW Y	174	P
175	CDGKPR RS	176	ACEFG HIPQST VW	177	ACDFG HLMQR STVW
178	EILVW	180	ACEPRS	181	ACDEF HIKLR
182	ACDEH NPQRS TVY	183	CDEGIK NPQRS V	184	ACDEF GHKLM PRSV
185	ADEFG IKPRST VWY	186	ADGHI KLNPR RSVW	187	AFGHIL MNQRS TVWY
188	ACFGH LMNPQ RSTVW	189	AEGHK LMNPR STVWY	190	CEFGH KLNQR STVW
191	AEEFGK LMPQR STVWY	192	CFGKL MNPQR VWY	193	ADKLM PV
194	ACILPS TV	195	S	197	C
198	VW	199	EGHIKL PRSW	200	AFGHK LMPQR SWY
201	AFLMN PRSTV W	202	AEEFGH KNPQR VWY	203	ADEGH LMNQR STV
204	ACEGH IKQRST	206	CDFGP Y	207	AFGMP QRSTV W
208	DGPW	209	CP	210	ACDEG KMNPS TVWY

211	CFGHI KMPRS TVW	212	AGHIK LMPVW	213	PS
214	ACDEG HKNPR STY	215	CP	216	DEGHI KLMNP QRTV
217	ACGHP QSTVW	218	AIKLPS V	219	P
220	GKNPR W	221	DEHKP R	222	PY
223	CDEGH KLPQR STVWY	224	ADEFG MPQRS TWY	225	ADEGH KPQRT VW
226	ACDEF GLNQR STVWY	227	AFGHIK LMPQR TVWY	228	AEFGH LMNPR STW
229	EFGKL PQTVW	230	AEGHK MNPRS TVWY	231	ACDFG HIKLPQ RSV
232	CGHKL NPQVY	233	DIPST	234	ADEGH NPSTV W
235	FLMRW Y	236	CILNQT Y	238	FGLPV WY
239	CFGHIL PRSTV WY	240	EFGNW Y	241	ACDEG IPRSTV W
242	ACDGI LMPRS TVW	243	CDFGH LMPQR SWY	244	ADGIV Y
245	ACFLP QRSTV	246	ACDEG HIKLM PSTVW	247	ACFHN PQRST WY
248	CDEGI MPT	249	AGHIK MQSY	250	CFGHK LMNPQ RSTVW
251	DFGHK PSTW	252	ADEFG HIKLN PSTY	253	ADEGH LMNQR SW
254	CDEGI KLPQR TVWY	255	CDLPV W	256	CDEG[
257	D	258	LPVW	260	CP
261	P	262	ADEGH IKQRST VWY	263	EFPQW
264	DEFGL MRTVW Y	265	ADFGH KLMNQ RS	266	ACGHM PQRST VW
267	DGHK NRSW	268	ACFGH KLN PQSTVW	269	EKLMN PQR

270	ACEFG HIPY	271	ADEHK TW	272	HLNPW
273	ACDGI LPQSV W	274	CEGHN QWY	275	AFGIKL MQTVW
276	FPW	278	MP	279	ACFGL WY
280	DIMNR STVW	281	ADGHI KNPQR SVW	282	FLVWY
283	ACDFW	284	CDFW	284	CIP
285	KPRTV	286	ACDFH KMPTY	287	ACDEG KLNPR RS
288	DEFGH IKPRT	289	ACEGH LPQRS Y	290	DQY
291	ACDEF MNTW Y	292	ILT	293	EN
294	AEGHK LNPQR STW	295	CGHILN PTVY	296	CFGIK MQRST VWY
297	CEHLN PQRST Y	298	CELMN PQSTW Y	299	ACDFG HLMPT T
300	ACDEF LMNPQ STVW	301	EGHKM NPQRS WY	302	CDEFG HLMPT STY
303	ACDEF GKLMR WY	304	ACDGI MNPQS TVY	305	LPQRS TVY
306	ACHIL VWY	307	CIP	308	CFLMV WY
310	CEFKL	311	CEFILP VW	312	CEMVW
313	C	314	CLW	315	CIV
316	EGIKL MPRST VWY	317	GP	318	CPW
319	CEFGHI KMPQR SVWY	320	CPV	321	EMP
322	CDEGI LNPRS TVW	323	ACEGH KNRST V	324	CFPVW Y
325	CREGH NW	327	AIEFGH NQRST VWY	329	CFGHI KLNQR STVWY
330	ACDEG ILMNP RSVW	331	ACDEF HKQRS TWY	332	ACDEF GHKLN PRSTY

333	GHIKP RSTWY	334	ACDEG MNRS	335	FGHIKL PVWY
336	AEEFGK NPRST VWY	337	CFGIKL MRTW	338	CDEFG HIKLPR TV
339	DEFGH LNPST VWY	340	ACDEF GHKPR STVW	341	AEGHK LMNQR STVY
342	DEFHK LMPQR TY	343	CDFIPW	344	FGHLM NPQRS TWY
345	ACEHK NQRTV Y	346	ADFGIK LMPRS TVW	347	CFIPTV W
348	CHILPQ RTVWY	349	DFGPV WY	350	ADEFH KLMNP RSTVY
351	CDEFH NRWY	352	ADEFG KMPQR STVWY	353	CFGHK LMQRS W
354	CDEGH IKLMP QSVWY	355	DFGHL MNPQR STVWY	356	CGKLP RTVW
357	DEFGL MQR	358	EHIKPQ RW	359	AFGLP W
360	ACEFGI KLMPQ RV	361	ACEGM NPQRS VW	362	ACEGH KLMNP RSTVW
363	ACDEF GHIPQ RSTVW	364	ACDEF GKLMP RSTVY	365	ACDEG MNPQR STWY
366	ACEFG KMPQR TW	367	EFILMQ V	368	CPW
369	CEFIKL PQVW	370	ADEGH KLNPO RSVY	371	P
372	ADEFG HKLNP RSTVW	373	CPW	374	DE
375	CFPVY	376	IPW	377	CILV
378	DEFIL MQTW Y	379	ACEFIL MW	380	CDEGQ RS
381	GLPWY	382	EGHKL MNPQR STWY	383	GP
384	CFMQS T	385	CLMPW Y	386	ACFGH ILMNQ RSTVY

387	CEFGHI LMNV WY	388	CGPQ	389	FV
390	ACEFG HLNPR STVWY	391	ADGHK NPQRS TVWY	392	CP
393	CP	394	ADEGI KNPQR STV	395	C;,[
396	CFGIPY	397	ACEFGI LMPQT V	398	ACEGH ILNPRS TVWY
399	DP	400	ADEFGI LMPQR STVY	401	CFHKR WY
402	ADEFL MPQRS TVWY	403	ACEGH KLMNP QRT	404	CDFGH LMNRV WY
405	CIV	406	PR	408	AEFGIK LPRST VWY
410	W	411	DEFG	412	EH
413	HIKLP	414	ADEGH KRST	415	CDEP
416	CS	417	ADEFG HKMPQ R	419	DP
420	ADFGH KLNRS TWY	422	CDGHL MNQRS Y	423	ADEFG HLM PQ RSTVW
424	ACEGH NQRSW Y	425	ELPWY	426	CFMR
427	ACFLP VWY	428	ACDEG HNRSY	429	ADKLN PSTVW Y
430	ADELM NSTV	431	P	432	CFIKL MPY
434	HKPQR W	437	T	438	Y
439	NR	440	Q	441	R
442	MNS	443	D		

3. Дополнительные модификации и конъюгация.

Модифицированные полипептиды PH20 включают полипептиды PH20, которые содержат химические или посттрансляционные модификации. В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 не содержат химические или посттрансляционные модификации. Химические и посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, сиалирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидрокселирование, фосфорилирование и другие модификации полипептидов, известные в данной области техники.

Также в дополнение к любой одной или нескольким предусмотренным в настоящем документе аминокислотным модификациям, таким как аминокислотные замены, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут быть конъюгированы или слиты с любым фрагментом, используя любой способ, известный в данной области техники, в том числе химические и рекомбинантные способы, при условии, что полученный полипептид сохраняет гиалуронидазную активность. Например, в дополнение к любой одной или нескольким предусмотренным в настоящем документе аминокислотным модификациям, таким как аминокислотные замены, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 также могут содержать другие модификации в первичной последовательности полипептида или не в первичной последовательности полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, модификацию углеводным фрагментом, полиэтиленгликолевым (PEG) фрагментом, фрагментом сиаловой кислоты, доменом Fc из иммуноглобулина G или любым другим доменом или фрагментом. Например, такие дополнительные модификации могут быть сделаны для увеличения стабильности белка или его периода полувыведения из сыворотки.

В некоторых примерах домен или другой фрагмент представляет собой агент направленного действия, включая любой агент, который направляет конъюгат в любой один или в несколько типов клеток путем селективного связывания с рецепторами на поверхности клеток или другими фрагментами на поверхности клеток. Например, домен или другой фрагмент представляет собой агент направленного действия, который направляет конъюгат в опухолевые клетки. В таких примерах модифицированный полипептид PH20, такой как любой приведенный здесь полипептид PH20, связан напрямую или не напрямую с агентом направленного действия. Такие агенты направленного действия включают, но не ограничиваются ими, факторы роста, цитокины, хемокины, антитела и гормоны или их аллельные варианты, мутеи-

ны или фрагменты, при условии, что агент направленного действия интернализируется с помощью рецептора на поверхности клетки. Примеры дополнительных модификаций, не имеющие ограничивающего характера, описаны ниже.

а) Пониженная иммуногенность.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 могут быть получены таким образом, чтобы иметь пониженную иммуногенность. Пониженная иммуногенность может быть обусловлена изменениями в последовательности, которые элиминируют антигенные эпитопы полипептида, или изменениями посттрансляционных модификаций. Специалист в данной области техники знаком со способами идентификации антигенных эпитопов в полипептиде (см. например, Liang et al. (2009) *BMC Bioinformatics*, 10:302; Yang et al. (2009) *Rev. Med. Virol.*, 19:77-96). В некоторых примерах, чтобы удалить или изменить антигенный эпитоп, могут быть модифицированы одна или несколько аминокислот.

В другом примере изменение гликозилирования белка также может влиять на иммуногенность. Например, предусмотрено изменение гликозилирования пептида при условии, что полипептиды, как минимум, содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозамин, присоединенный к аминокислотному остатку, соответствующему аминокислотному остатку, приведенному как остатки N200, N333 и N358 в SEQ ID NO: 3 или 7.

Например, полипептиды РН20 могут быть модифицированы таким образом, чтобы не содержать фукозу, в частности бифукозилирование. В частности, предусмотренные в настоящем документе полипептиды РН20 не бифукозилированы. Этого можно достичь, экспрессируя и продуцируя полипептид РН20 в клетках-хозяевах, которые не осуществляют бифукозилирование. Фукоза представляет собой дезоксигексозу, которая присутствует в различных организмах, в том числе в млекопитающих, насекомых и растениях. Фукозилированные гликаны синтезируются с помощью фукозилтрансфераз; см., например, Ma et al., *Glycobiology*, 16(12):158R-184R, (2006); Nakayama et al., *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); Sturla et al., *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005). У человека фукоза часто присутствует в виде концевой модификации структур гликанов, и было показано, наличие фукозы, связанной через α 1,6-связь с N-ацетилглюкозамином, важно для процессинга и узнавания гликопротеинов. У насекомых коровые структуры N-гликанов бифукозилированы через α 1,6- и α 1,3-связи. Коровое фукозилирование клеток насекомых с α 1,3-связями формирует углеводный эпитоп, являющийся иммуногенным для человека (см., например, опубликованную заявку США № 20070067855). Например, предусмотренные в настоящем документе полипептиды РН20 могут быть получены в клетках-хозяевах, не способных бифукозилировать полипептид. Таким образом, хотя для экспрессии полипептидов могут использоваться клетки насекомых или другие клетки, которые могут осуществлять бифукозилирование, как правило, используют клетки млекопитающих, такие как клетки СНО.

В некоторых примерах дефукозилированные или дефицитные по фукозе полипептиды РН20 могут быть получены в клетках насекомых с модифицированными путями гликозилирования, полученных с применением экспрессирующих векторов на основе бакуловируса, содержащих эукариотические гены процессинга олигосахаридов, тем самым создавая "маммализированные" системы экспрессии на основе клеток насекомых (см., например, патент США № 6461863). Альтернативно, антигенность можно элиминировать путем экспрессии полипептидов РН20 в клетках насекомых, в которых отсутствует α 1,3-фукозилтрансфераза (FT3) (см., например, опубликованную заявку США № 20070067855). В других примерах дефукозилированные или дефицитные по фукозе полипептиды РН20 могут быть получены, например, в клеточных линиях, которые продуцируют дефукозилированные белки, в том числе в клетках Lee 13 СНО, дефицитных по фукозилированию белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); опубликованная заявка США № 2003/0157108 и WO 2004/056312), в нокаутных клеточных линиях, таких как клеточные линии, нокаутные по гену α 1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутные клетки СНО (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

б) Конъюгация с полимерами.

В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 конъюгированы с полимерами. Примеры полимеров, которые могут быть конъюгированы с полипептидами РН20, включают природные и синтетические гомополимеры, такие как полиолы (т.е. поли-ОН), полиамины (т.е. поли-NH₂) и поликарбоновые кислоты (т.е. поли-COОН), и также гетерополимеры, т.е. полимеры, содержащие одну или несколько различных связывающих групп, например гидроксильных групп и аминокислотных групп. Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из полиалкиленоксидов (РАО), таких как полиалкиленгликоли (РАГ), в том числе полиэтиленгликоли (РЕГ), метоксиполиэтиленгликоли (mРЕГ) и полипропиленгликоли, РЕГ-глицидиловых эфиров (Ерох-РЕГ), РЕГ-оксикарбонилимидазолов (СДИ-РЕГ), разветвленных полиэтиленгликолей (РЕГs), поливинилового спирта (РВА), поликарбоксилатов, поливинилпирролидона, поли-D,L-аминокислот, сополимеров этилена с малеиновым ангидридом, сополимеров стирола с малеиновым ангидридом, декстранов, в том числе карбоксиметилдекстранов, гепарина, гомологичного альбумина, целлюлозы, в том числе метилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлозы, гидроксипропилцеллю-

лозы, карбоксиэтилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы, гидролизатов хитозана, крахмалов, таких как гидроксипропилкрахмалы и гидроксипропилкрахмалы, гликогена, агарозы и их производных, гуаровой камеди, пуллулана, инулина, ксантановой камеди, каррагенана, пектина, гидролизатов альгиновой кислоты и биополимеров.

Как правило, полимеры представляют собой полиалкиленоксиды (РАО), такие как полиэтиленоксиды, такие как PEG, как правило mPEG, которые имеют несколько функциональных групп, способных к перекрестному сшиванию. Как правило, полимеры представляют собой нетоксичные полимерные молекулы, такие как (метокси)полиэтиленгликоль (mPEG), которые могут быть ковалентно конъюгированы с полипептидами РН20 (например, с группами на поверхности белка) с использованием относительно простых химических методик.

Подходящие полимерные молекулы для присоединения к полипептидам РН20 включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (PEG) и производные PEG, такие как метоксиполиэтиленгликоли (mPEG), PEG-глицидилловые эфиры (Ерох-PEG), PEG-оксикарбонилимидазол (CDI-PEG), разветвленные PEG и полиэтиленоксиды (PEO) (см., например, 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; и Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004). Полимерная молекула может иметь молекулярную массу, как правило, в диапазоне от примерно 3 до примерно 60 кДа. В некоторых вариантах воплощения полимерная молекула, конъюгированная с предусмотренным в настоящем документе полипептидом РН20, имеет молекулярную массу 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или больше чем 60 кДа.

В данной области техники известны различные способы модификации полипептидов путем ковалентного присоединения (конъюгирования) PEG или производных PEG (т.е. "пегилирования") (см., например, US 2006/0104968; US 5672662; US 6737505 и US 2004/0235734). Методы пегилирования включают, но не ограничиваются этим, применение специальных линкеров и химических методик связывания (см., например, Roberts, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), присоединение многочисленных фрагментов PEG к одному единственному сайту конъюгации (например, используя разветвленные PEG; см., например, Guiotto et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-специфическое пегилирование и/или монопегилирование (см., например, Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999), и сайт-направленное ферментативное пегилирование (см., например, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (см. также, например, Lu and Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu and Felix (1993) *Peptide Res.* 6:140-6, 1993; Felix et al. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu et al. (1995) *J. Immunol.* 154:3088-95; см. also, Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 и Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Способами и методами, описанными в данной области техники, можно получить белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше чем 10 PEG или производных PEG, присоединенных к одной единственной молекуле белка (см., например, US 2006/0104968).

В данной области техники были описаны различные реактивы для пегилирования. Такие реактивы включают, но не ограничиваются ими, активированный N-гидроксисукцинимидом (NHS) PEG, сукцинимидил mPEG, mPEG2-N-гидроксисукцинимид, mPEG сукцинимидил α -метилбутаноат, mPEG сукцинимидил пропионат, mPEG сукцинимидил бутаноат, сукцинимидиловый эфир mPEG карбоксиметил 3-гидроксибутановой кислоты, гомобифункциональный PEG-сукцинимидил пропионат, гомобифункциональный PEG пропиональдегид, гомобифункциональный PEG бутиральдегид, PEG малеимид, PEG гидразид, п-нитрофенилкарбонат PEG, mPEG-бензотриазол карбонат, пропиональдегид PEG, mPEG бутиральдегид, разветвленный mPEG2 бутиральдегид, mPEG ацетил, mPEG пиперидон, mPEG метилкетон, mPEG малеимид "без линкера", mPEG винилсульфон, mPEG тиол, mPEG ортопиридилтиоэфир, mPEG ортопиридилдисульфид, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, винилсульфон PEG-NHS, акрилат PEG-NHS, флуоресцеин PEG-NHS и биотин PEG-NHS (см., например, Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; US 5672662; US 5932462; US 6495659; US 6737505; US 4002531; US 4179337; US 5122614; US 5324844; US 5446090; US 5612460; US 5643575; US 5766581; US 5795569; US 5808096; US 5900461; US 5919455; US 5985263; US 5990237; US 6113906; US 6214966; US 6258351; US 6340742; US 6413507; US 6420339; US 6437025; US 6448369; US 6461802; US 6828401; US 6858736; US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; US 2005/0114037; US 2005/0171328; US 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; WO 0187925 и WO 2005000360).

D. Способы идентификации модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов с измененными свойствами или активностью

В настоящем документе предусмотрены способы идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или его варианта, такого как модифицированная гиалуронидаза или модифицированный полипептид РН20, который обладает измененной активностью или свойством по срав-

нению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом. В частности, предусмотренные в настоящем документе способы могут использоваться для скрининга одного или нескольких модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов, таких как модифицированная гиалуронидаза или полипептид РН20, которые обладают повышенной активностью и/или повышенной стабильностью в присутствии денатурирующего агента или условия. Например, способы могут использоваться для идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или его варианта, такого как модифицированная гиалуронидаза или ее вариант, или модифицированный полипептид РН20 или его вариант, которые обладают повышенной стабильностью благодаря повышенной устойчивости к денатурирующим условиям, включая устойчивость к денатурирующим условиям, вызванным температурой (например, повышенной температурой, такой как нагревание), перемешиванием, отсутствием или низким содержанием соли, присутствием эксципиента и/или денатурирующего агента, но не ограничиваясь этим. Примеры денатурирующих агентов или эксципиентов включают антиадгезионные агенты, связывающие агенты, агенты для покрытия оболочкой, наполнители и разбавители, вкусоароматические агенты, красители, смазывающие вещества, глицеролы, консерванты, детергенты, сорбенты или подсластители, но не ограничиваются ими. Например, различные эксципиенты, такие как консерванты, могут действовать как агенты, денатурирующие белок. В описываемом способе активность также можно сравнить с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в одинаковых денатурирующих условиях, и модифицированный деградирующий гиалуронан фермент идентифицируют или выбирают, если он обладает большей активностью, чем соответствующий не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент.

В описываемом способе предусмотрены один или несколько модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов. В некоторых примерах получена библиотека модифицированных молекул. Способы мутагенеза и получения библиотек или выборок вариантов молекул с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК описаны в настоящем документе и известны специалистам в данной области техники. В одном из примеров тестируемые ферменты могут быть объединены и подвергнуты скринингу, при этом способ допускает отбор только тех ферментов, которые обладают желаемой активностью. В другом примере тестируемые ферменты могут быть физически разделены и подвергнуты скринингу индивидуально, например, с помощью чипов, таких как адресуемые чипы.

В одном из аспектов способа модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты тестируют или подвергают скринингу на гиалуронидазную активность в присутствии или в отсутствие одного или нескольких денатурирующих условий или денатурирующего агента. Чтобы идентифицировать модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты, которые обладают активностью в присутствии денатурирующего условия, активности оценивают после тестирования при обоих наборах условий. Желаемый уровень или величина активности, выбранные в описываемых способах в качестве порогового значения, могут быть определены опытным путем пользователем и зависят от факторов, таких как конкретный деградирующий гиалуронан фермент, желаемое применение деградирующего гиалуронан фермента, конкретное денатурирующее условие или денатурирующий агент или другие аналогичные факторы. Как правило, идентифицируют модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который обладает по меньшей мере 5 или 10% активности в присутствии денатурирующего агента или условия по сравнению с их отсутствием, и обычно по меньшей мере 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или большей активностью, например по меньшей мере 40% активности.

Дополнительно или альтернативно, активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в присутствии одного или нескольких денатурирующих условий или денатурирующих агентов сравнивают с активностью соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в присутствии того же самого денатурирующего условия или денатурирующего агента (тех же самых денатурирующих условий или денатурирующих агентов). В таких примерах активность модифицированного и не модифицированного фермента тестируют при одинаковых условиях (например, время, температура, композиция), за исключением различий в конкретных тестируемых ферментах (не модифицированный фермент против модифицированного фермента). Идентифицируют модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который обладает большей активностью, такой как по меньшей мере 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500% или большей активностью по сравнению с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента.

Способ можно осуществлять множество раз, при этом стадии способа повторяют 1, 2, 3, 4 или 5 раз. Предусмотренный в настоящем документе способ также является итеративным. В одном из примеров после осуществления способа любой идентифицированный модифицированный деградирующий гиалуронан фермент может быть модифицирован или дополнительно модифицирован, чтобы увеличить или оптимизировать активность.

Описание стадий способа и компонентов способа предусмотрено в нижеследующих подразделах.

1. Деградирующие гиалуронан ферменты и библиотеки модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов.

В способах в настоящем документе один или несколько модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов, таких как гиалуронидаза или полипептид РН20, тестируют на желаемую активность

или свойство, такое как повышенная стабильность (например, повышенная устойчивость к денатурирующему условию). Модифицированный деградирующий гиалуронан фермент может быть модифицирован по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом, таким как любой деградирующий гиалуронан фермент, известный в данной области техники. Деградирующие гиалуронан ферменты представляют собой семейство ферментов, которые деградируют гиалуроновою кислоту, являющуюся важным компонентом внеклеточного матрикса и основным составляющим интерстициального барьера. Деградирующие гиалуронан ферменты деградируют гиалуронан путем расщепления полимеров гиалуронана, которые состоят из повторяющихся дисахаридных единиц: D-глюкуроновой кислоты (GlcA) и N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc), попеременно соединенных друг с другом β -1 \rightarrow 4 и β -1 \rightarrow 3 гликозидными связями. Катализируя гидролиз гиалуроновою кислоты, основного составляющего интерстициального барьера, деградирующие гиалуронан ферменты уменьшают вязкость гиалуроновою кислоты, тем самым увеличивая проницаемость ткани. Соответственно, деградирующие гиалуронан ферменты для применений и способов, предусмотренных здесь, включают любой фермент, способный катализировать расщепление дисахаридной цепи или полимера гиалуронана. В некоторых примерах деградирующий гиалуронан фермент расщепляет β -1 \rightarrow 4 гликозидную связь в цепи или в полимере гиалуронана. В других примерах деградирующий гиалуронан фермент катализирует расщепление β -1 \rightarrow 3 гликозидной связи в цепи или в полимере гиалуронана.

Деградирующие гиалуронан ферменты включают ферменты, которые являются связанными с мембраной или представляют собой растворимые формы, секретируемые клетками. Таким образом, если деградирующие гиалуронан ферменты включают сигнальную последовательность гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря, и/или закорены в мембране другим способом, или являются нерастворимыми, то такие деградирующие гиалуронан ферменты могут быть предусмотрены в растворимой форме за счет укорочения С-конца или делеции всей сигнальной последовательности GPI якоря или ее части для получения секретируемого и растворимого фермента. Таким образом, деградирующие гиалуронан ферменты включают укороченные с С-конца варианты, например деградирующие гиалуронан ферменты, укороченные с целью удаления всей или части сигнальной последовательности GPI якоря. Примерами таких растворимых гиалуронидаз являются растворимые гиалуронидазы PH20, такие как любые приведенные в патенте США № 7767429; в опубликованных заявках США №№ US 2004/0268425 и US 2010/0143457.

Примерами деградирующих гиалуронан ферментов являются гиалуронидазы животных, не относящихся к человеку, или гиалуронидазы человека, бактериальные гиалуронидазы, гиалуронидазы из пиявок или хондроитиназы, которые обладают активностью разрушения гиалуронана, в том числе их активные растворимые или укороченные формы. Примерами гиалуронидаз животных, не относящихся к человеку, являются любые гиалуронидазы, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 8-31, 856-861, 869, 870, 871-886, или их зрелые формы, их укороченные с С-конца варианты, являющиеся растворимыми и активными, или их активные формы. Примерами гиалуронидаз человека являются любые гиалуронидазы, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 7, 32-66, 68-72 или 887-890, или их зрелые формы, укороченные с С-конца варианты, являющиеся растворимыми и активными, или их активные формы, и, в частности, любые из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. Примерами бактериальных гиалуронидаз являются любые гиалуронидазы, приведенные в любой из SEQ ID NOS: 891-919 или их зрелые формы, укороченные с С-конца варианты, являющиеся растворимыми и активными, или их активные формы. Примерами гиалуронидаз из пиявок являются любые гиалуронидазы, приведенные в SEQ ID NO: 920 или 921, или их зрелые формы, укороченные с С-конца варианты, являющиеся растворимыми и активными, или их активные формы. Примерами хондроитиназ, которые обладают деградирующей гиалуронан энзиматической активностью, являются хондроитиназы, приведенные в SEQ ID NO: 922-924, или их зрелые формы, укороченные с С-конца варианты, являющиеся растворимыми и активными, или их активные формы.

Например, один или несколько модифицированных полипептидов PH20 тестируют на желаемую активность или свойство, такое как повышенная стабильность (например, повышенная устойчивость к денатурирующему условию). Модифицированный полипептид PH20 может быть модифицирован по сравнению с не модифицированным полипептидом PH20, таким как любой известный природный полипептид PH20, полипептид PH20 дикого типа или полипептид сравнения. Например, модифицированный полипептид PH20 модифицирован по сравнению с полноразмерной, растворимой или активной формой полипептида PH20, такой как любой полипептид PH20, приведенный в любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72, или по сравнению с полипептидом, который обладает по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 3, 7, 32-66, 69 или 72. В конкретных примерах способа по настоящему документу первоначальный или не модифицированный полипептид PH20 имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 3.

Библиотеки или выборки модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов можно подвергать скринингу. Деградирующие гиалуронан ферменты могут быть модифицированы любым спосо-

бом, известным специалисту в данной области техники, с помощью которого можно изменить структуру белка. Примеры модификаций включают замену, добавление и делецию одной или нескольких аминокислот белка для создания библиотеки или выборки модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов. Получение модифицированных белков или вариантов белков для применения в способах согласно настоящему документу находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Способы мутагенеза хорошо известны в данной области техники и включают, например, сайт-направленный мутагенез, такой как, например QuikChange (Stratagene) или насыщающий мутагенез. Способы мутагенеза включают, но не ограничиваются ими, сайт-специфический мутагенез, мутагенез с помощью ПЦР, кассетный мутагенез, сайт-направленный мутагенез, случайный точечный мутагенез, мутагенез с использованием матриц, содержащих урацил, сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов, мутагенез с использованием фосфотиоат модифицированной ДНК, мутагенез с использованием двухцепочечной ДНК, содержащей разрывы, точечную репарацию ошибочно спаренных оснований, мутагенез с использованием штаммов-хозяинов, дефицитных по системе репарации, рестриктию-селекцию и рестриктию-очистку, мутагенез с помощью делеции, мутагенез с помощью полного синтеза гена, репарацию двухцепочечных разрывов и многие другие способы, известные специалисту. В способах в настоящем документе мутагенез можно осуществить по всей длине белка или в определенной области белка. Мутагенез можно осуществлять рационально или случайно.

В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе способы осуществляют таким образом, что идентичность каждого мутантного белка известна *a priori* перед тестированием белка. Например, предусмотренные в настоящем документе способы могут быть приспособлены к мутагенезу и скринингу или способам тестирования, которые являются адресными. Это обеспечивает простоту сравнения активностей тестируемых белков без необходимости секвенирования идентифицированных белков. Например, для индивидуального получения мутантных белков можно использовать способы сайт-направленного мутагенеза. Мутагенез можно осуществить с помощью поочередной замены единственного аминокислотного остатка в определенных целевых позициях, так что каждый полученный индивидуальный мутант является единственным продуктом в каждой отдельной реакции мутагенеза. Мутантные молекулы ДНК могут быть спроектированы, получены с помощью мутагенеза и клонированы индивидуально, например, в адресных чипах, так что они физически разделены друг от друга и каждая является единственным продуктом независимой реакции мутагенеза. Аминокислоты, выбранные для замены целевых позиций в конкретном оптимизируемом белке, могут представлять собой либо все оставшиеся 19 аминокислот, либо более ограниченную группу, содержащую только выбранные аминокислоты. В некоторых предусмотренных в настоящем документе способах каждая замещаемая аминокислота замещена независимо на 19 оставшихся аминокислот или каждая замещаемая аминокислота замещена меньше чем на 19 оставшихся аминокислот, например на 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 оставшихся аминокислот.

2. Скрининг или тестирование на желаемую активность или свойство.

Гиалуронидазную активность или другую активность композиции, содержащей модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, подвергают скринингу или тестируют в условиях воздействия на деградирующий гиалуронан фермент денатурирующего условия или денатурирующего агента (наличие денатурирующего условия или денатурирующего агента). Денатурирующее условие или денатурирующий агент не обязательно должны представлять собой условие или агент, которые полностью денатурируют фермент, но обычно представляют собой любое условие или агент, которые дестабилизируют энзиматическую активность с течением времени. Например, денатурирующее условие может представлять собой условие, созданное температурой (например, повышенная температура, такая как температура выше чем 30°C или примерно 30°C, или 30°C, например от 30 до 42°C, такая как температура 37°C или примерно 37°C), перемешиванием, отсутствием или низким содержанием соли (например, NaCl), и/или денатурирующее условие может быть создано присутствием денатурирующего агента, например присутствием эксципиентов (например, присутствием консервантов).

С целью отбора или идентификации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, который обладает стабильностью или повышенной стабильностью в денатурирующих условиях, активность можно сравнивать с активностью модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в отсутствие денатурирующего условия и/или активностью соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента при наличии денатурирующего условия. Например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент также можно подвергать скринингу или тестированию в тех же самых условиях за исключением присутствия денатурирующего условия или денатурирующего агента (отсутствие денатурирующего условия или денатурирующего агента). Если желательно, активность соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента (например, деградирующего гиалуронан фермента, не содержащего аминокислотную замену (замены)) также можно тестировать при тех же самых денатурирующих условиях или в присутствии денатурирующего агента, воздействию которых подвергали деградирующий гиалуронан фермент.

Например, каждый член библиотеки или выборки модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов инкубируют или подвергают воздействию одного или нескольких денатурирующих условий. Инкубацию или воздействие может осуществить *in vivo* или *in vitro*. Как правило, анализ проводят *in*

vitro. Тот же самый модифицированный фермент также подвергают воздействию или инкубируют в условиях сравнения или в контрольных условиях, которые не являются денатурирующими условиями. Чтобы идентифицировать модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты, которые обладают стабильностью при воздействии денатурирующего условия или условий, активности при обоих условиях сравнивают. Кроме того, при скрининге или идентификации активности фермента при двух различных наборах условий обычно единственным изменяемым в анализе условием является присутствие или отсутствие одного или нескольких денатурирующих условий. Другие условия анализа, включая, но не ограничиваясь этим, время, температура и/или другие условия инкубации, могут быть одинаковыми для обоих наборов условий.

Например, воздействие может быть достигнуто путем инкубации модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в буфере для анализа или в композиции, которая была модифицирована или изменена, чтобы содержать денатурирующий агент, такой как эксципиент, или иметь низкое содержание соли, или не содержать соль. Примеры денатурирующих агентов или эксципиентов включают антиадгезионные агенты, связывающие агенты, агенты для покрытия оболочкой, наполнители и разбавители, вкусоароматические агенты, красители, смазывающие вещества, глуданты, консерванты, сорбенты или подсластители, но не ограничиваются ими. Выбор буфера может быть осуществлен эмпирически специалистом в данной области техники в зависимости от конкретного модифицируемого параметра или параметров. Примерами таких буферов для анализа являются буферы Гуда (см., например, Good et al. (1966) *Biochemistry*, 5:467-477). Примеры таких буферов включают ACES, ADA, BES, бицин, бис-трис, CAPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, трис или буферы Trizma®, но не ограничиваются ими. Кроме того, количество или концентрацию эксципиента или соли специалист в данной области техники может определить опытным путем в зависимости от выбора эксципиента или соли и желаемого уровня или активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента.

В одном из примеров буфер для анализа или композиция модифицированы включением некоторого количества денатурирующего агента или денатурирующего эксципиента, являющего консервантом, например фенольным консервантом. Фенольный консервант может представлять собой фенол, метакрезол (м-крезол), бензиловый спирт и парабены, в том числе метилпарабен и пропилпарабен. В частности, фенольный консервант представляет собой фенол и/или м-крезол. Общее количество одного или нескольких фенольных консервантов, выраженное в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем), может находиться в диапазоне между 0,05 и 0,6%, 0,1 и 0,4%, 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4% включительно. В таком примере активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента тестируют или оценивают в присутствии такого общего количества (например, между или примерно между 0,05 и 0,6%) одного или нескольких консервантов, например одного или нескольких фенольных консервантов. В некоторых примерах модифицированный деградирующий гиалуронан фермент также можно тестировать или оценивать в контрольных условиях или в условиях сравнения, в которых буфер для анализа или композиция не модифицированы и не содержат консервант. В некоторых примерах в качестве контроля активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента также можно сравнить с активностью соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, не содержащего модификацию (модификации), в условиях с присутствием консерванта и/или в условиях, при которых консервант отсутствует.

В другом примере буфер для анализа модифицирован низким содержанием соли или ее отсутствием, что является денатурирующим условием. Как обсуждалось в настоящем документе, деградирующие гиалуронан ферменты, такие как PH20, обычно требуют наличия соли (например, NaCl, Lys-Lys или $MgCl_2$) для активности. Таким образом, отсутствие соли или низкое содержание соли являются денатурирующими условиями для фермента. В одном из примеров буфер для анализа модифицирован включением соли в количестве менее 100 мМ, например менее 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 мМ или меньше. В таком примере активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента тестируют или оценивают в отсутствие соли или в присутствии соли в концентрации меньше чем 100 мМ. В некоторых примерах модифицированный деградирующий гиалуронан фермент также можно тестировать или оценивать в контрольных условиях или в условиях сравнения, в которых буфер для анализа содержит высокую концентрацию соли, обычно между или примерно между 140 и 200 мМ. В некоторых примерах в качестве контроля активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента также можно сравнить с активностью соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, не содержащего модификацию (модификации), в условиях низкого содержания соли или ее отсутствия, таких как менее 100 мМ соли, и/или в условиях концентрации соли в количестве между или примерно между 140 и 200 мМ.

Воздействие на деградирующий гиалуронан фермент денатурирующего условия также можно обеспечить инкубацией модифицированного деградирующего гиалуронан фермента в условиях, известных как денатурирующие, таких как условия повышенных температур, таких как температуры выше 30°C или примерно 30°C или 30°C (например, от 30 до 42°C, например при 37°C или примерно при 37°C) или перемешивание. Например, активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента тестируют при повышенных температурах более чем или примерно или от 30 до 42°C. В некоторых приме-

рах модифицированный деградирующий гиалуронан фермент также можно тестировать или оценивать при контрольных условиях или при условиях сравнения, при которых температура меньше 30°C, например между или примерно между 0 и 25°C, например между 0 и 5°C или между 18 и 25°C. В некоторых примерах в качестве контроля активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента также можно сравнить с активностью соответствующего не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, не содержащего модификацию (модификации), при повышенных температурах более чем или примерно или от 30 до 42°C и/или при температурах меньше чем 30°C, таких как между или примерно между 0 и 25°C, например между 0 и 5°C или между 18 и 25°C.

Модифицированный деградирующий гиалуронан фермент можно подвергнуть воздействию одного или более чем одного денатурирующего условия. Воздействию одного условия деградирующий гиалуронан фермент можно подвергать одновременно с воздействием одного или нескольких других условий, после воздействия одного или нескольких других условий, с перерывом или периодически с воздействием одного или нескольких других условий.

В одном из примеров в способе согласно настоящему документу модифицированный деградирующий гиалуронан фермент инкубируют или подвергают воздействию денатурирующего условия или денатурирующего агента перед проведением анализа гиалуронидазной активности. Например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент инкубируют в присутствии денатурирующего агента или подвергают воздействию одного или нескольких денатурирующих условий или контрольных условий, таких как одно или несколько денатурирующих условий или контрольных условий, описанных выше. Инкубация или воздействие может быть в течение любого периода времени, и время может быть определено опытным путем специалистом в данной области техники. Например, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент можно инкубировать или подвергать воздействию одного или нескольких денатурирующих условий, денатурирующих агентов или контрольных условий в течение или примерно в течение от 1 мин до 1 месяца, например от 1 мин до 3 недель, от 1 мин до 2 недель, от 1 мин до 1 недели, от 1 мин до 24 ч, от 1 мин до 12 ч, например от 30 мин до 6 ч или от 1 до 4 ч и обычно по меньшей мере или примерно по меньшей мере 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч. После завершения инкубации или воздействия оценивают гиалуронидазную активность образца или композиции, содержащей модифицированный деградирующий гиалуронан фермент (или контрольный не модифицированный фермент). В другом примере модифицированный деградирующий гиалуронан фермент подвергают воздействию или инкубируют при одном или нескольких денатурирующих условиях и одновременно или параллельно с этим оценивают гиалуронидазную активность. Понятно, что в любых примерах в настоящем документе, где оценивают модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, для сравнения также можно оценить не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, не содержащий модификацию (модификации), в аналогичных условиях анализа.

Анализ для оценки гиалуронидазной активности хорошо известны в данной области техники. Примеры таких анализов описаны в разделе G. В одном из примеров гиалуронидазную активность можно оценить с помощью микротурбидиметрического анализа, в котором после реакции фермента с НА измеряют количество недеградированного НА, добавляя реагент, осаждающий НА (например, цетилпиридиний хлорид (CPC) или подкисленная сыворотка). В другом примере гиалуронидазную активность можно оценить, используя микротитрационный анализ, в котором измеряют биотинилированную гиалуроновую кислоту, оставшуюся после инкубации с гиалуронидазой (см., например, Frost and Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, опубликованную заявку США № 20050260186). При каждом тестируемом условии определяют и сравнивают полученные значения активности.

3. Отбор или идентификация.

В способе скрининга модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов при одном или нескольких денатурирующих условиях сравнивают гиалуронидазные активности тестируемых ферментов. Способ применяется для того, чтобы идентифицировать модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который более устойчив к денатурации под действием денатурирующего условия или денатурирующего агента, при этом активность фермента является показателем стабильности фермента, его устойчивости к денатурации. Понятно, что некоторое снижение активности фермента вследствие денатурации может быть допустимо в различных применениях, и, таким образом, способ можно применять для отбора модифицированных деградирующих гиалуронан ферментов, которые обладают необходимой активностью при воздействии денатурирующего условия, чтобы сделать возможным их применение (например, терапевтическая активность). Например, может быть выбран модифицированный фермент, который теряет активность медленнее, чем соответствующий не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент или деградирующий гиалуронан фермент сравнения, и остаточная активность которого достаточна для конкретного применения или цели.

В примерах способов в настоящем документе активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента оценивают при воздействии первого денатурирующего условия и также оценивают при воздействии второго условия, которое является контрольным или не денатурирующим условием, и сравнивают полученные гиалуронидазные активности. Для сравнения в некоторых примерах активность можно представить в виде соотношения активностей или в виде процента активности в присутствии де-

натурирующего условия по сравнению с контрольным условием. Например, если параметром, который различается для первого и второго условия, является присутствие консерванта (например, фенольного консерванта), активность можно представить в виде соотношения активностей или в виде процента активности, наблюдаемой в присутствии консерванта (например, фенольного консерванта), по сравнению с активностью в отсутствии консерванта (например, фенольного консерванта). В другом примере, если параметром, который различается для первого и второго условия, является температура, активность можно представить в виде соотношения активностей или в виде процента активности, наблюдаемой при повышенной температуре (например, от 30 до 42°C) по сравнению с активностью при более низкой температуре, такой как от 0 до 25°C, например от 0 до 5°C или от 18 до 25°C.

Выбирают или идентифицируют модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который сохраняет и обладает любой желаемой активностью в присутствии денатурирующего условия по сравнению с его отсутствием. Конкретное пороговое значение активности для отбора ферментов в настоящем документе зависит от конкретного применения и/или осуществления способа и может быть определено опытным путем в зависимости от таких факторов, как конкретное денатурирующее условие или денатурирующий агент, конкретный модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, желаемое применение идентифицированного или выбранного деградирующего гиалуронан фермента или других аналогичных факторов. Обычно, выбранный или идентифицированный модифицированный деградирующий гиалуронан фермент обладает стабильностью, если при воздействии или инкубации в денатурирующем условии или с денатурирующим агентом измеряют или выявляют любую обнаруживаемую активность. Например, выбранный или идентифицированный модифицированный деградирующий гиалуронан фермент обладает стабильностью или устойчив к денатурирующему условию или денатурирующему агенту, если он обладает по меньшей мере 5 или 10% от активности того же самого фермента в отсутствие денатурирующего условия или денатурирующего агента, и обычно, если модифицированный деградирующий гиалуронан фермент обладает активностью, которая составляет по меньшей мере 15% от первоначальной гиалуронидазной активности перед инкубацией в присутствии денатурирующего условия. Например, выбирают или идентифицируют модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, который обладает по меньшей мере (или по меньшей мере примерно) 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500% или больше от первоначальной гиалуронидазной активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента, тестируемой в контрольных условиях или не денатурирующих условиях.

В других примерах способов согласно настоящему документу активность модифицированного деградирующего гиалуронан фермента оценивают при воздействии денатурирующего условия, и активность не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента также оценивают при воздействии тех же самых денатурирующих условий. В таких примерах активности сравнивают, когда ферменты подвергают воздействию одинаковых условий. Для сравнения, активность в присутствии денатурирующего условия можно представить в виде отношения или процента активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента по сравнению с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или деградирующего гиалуронан фермента сравнения. В таких примерах выбирают модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, активность которого в присутствии денатурирующего условия больше, чем активность не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или деградирующего гиалуронан фермента сравнения. Таким образом, модифицированный деградирующий гиалуронан фермент более устойчив при данном условии. Например, если денатурирующим условием является присутствие консерванта (например, фенольного консерванта), наблюдаемую активность в присутствии консерванта (например, фенольного консерванта) можно представить в виде отношения активностей или в виде процента активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента по сравнению с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или деградирующего гиалуронан фермента сравнения. В другом примере, если денатурирующее условие представляет собой высокую температуру, наблюдаемую при повышенных температурах активность (например, от 30 до 42°C) можно представить в виде отношения активностей или в виде процента активности модифицированного деградирующего гиалуронан фермента по сравнению с активностью не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или деградирующего гиалуронан фермента сравнения.

В таких примерах идентифицируют или выбирают такой модифицированный деградирующий гиалуронан фермент, такой как модифицированный PH20, для которого отношение активностей составляет более чем или по меньшей мере 1,1, так что фермент обладает большей активностью, чем не модифицированный деградирующий гиалуронан фермент или деградирующий гиалуронан фермент сравнения в присутствии денатурирующего условия. Например, соотношение составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 или больше. Модифицированный деградирующий гиалуронан фермент (например, модифицированный PH20) может быть выбран, если его активность составляет по меньшей мере 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500% или больше от активности не модифицированного деградирующего гиалуронан фермента или деградирующего гиалуронан фермента сравнения, если тестировать их при

одинаковых условиях. Таким образом, идентифицируют деградирующие гиалуронан ферменты, которые обладают большей или лучшей стабильностью по сравнению с не модифицированным деградирующим гиалуронан ферментом или деградирующим гиалуронан ферментом сравнения, что проявляется как увеличение устойчивости к денатурирующему условию или денатурирующему агенту.

4. Итеративные способы.

Предусмотренный в настоящем документе способ также является итеративным. В одном из примеров после осуществления способа любые модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты, которые были идентифицированы как обладающие стабильностью, такой как повышенная стабильность, в присутствии денатурирующего условия, могут быть модифицированы или дополнительно модифицированы для увеличения или оптимизации стабильности. Вторичную библиотеку можно создать путем введения дополнительных модификаций в первый идентифицированный модифицированный деградирующий гиалуронан фермент. Например, модификации, которые были идентифицированы как обеспечивающие стабильность, такую как повышенная стабильность, могут быть комбинированы для создания комбинаторной библиотеки. Вторичную библиотеку можно тестировать, используя анализы и способы, описанные в настоящем документе.

В другом примере итеративного аспекта способа модифицированные деградирующие гиалуронан ферменты, которые были идентифицированы как не обладающие стабильностью, такой как повышенная стабильность (например, такие, что они не являются активными или не обладают повышенной активностью в присутствии денатурирующего условия), могут быть в дальнейшем модифицированы и снова протестированы на стабильность при денатурирующем условии. Последующие модификации можно нацеливать на конкретные области (например, конкретные аминокислотные остатки), ассоциированные с активностью и/или стабильностью молекулы. Например, остатки, ассоциированные с активностью и/или стабильностью молекулы, обычно представляют собой критические остатки, которые участвуют в структурном фолдинге или в другой активности молекулы. Таким образом, такие остатки необходимы для проявления активности, обычно в любых условиях. Критические остатки могут быть идентифицированы, поскольку, когда они мутированы, нормальная активность белка пропадает или снижается. Например, критические остатки могут быть идентифицированы так как, когда они мутированы в деградирующем гиалуронан ферменте, то он обладает пониженной гиалуронидазной активностью или не обладает гиалуронидазной активностью при нормальных или контрольных условиях анализа. Последующую библиотеку модифицированных белков можно получить с помощью аминокислотных мутаций, направленных на аминокислотные остатки, идентифицированные как критические, или вблизи них, например, с помощью аминокислотных мутаций, направленных на остатки, соседние с аминокислотными остатками, идентифицированными как критические. В некоторых примерах мутации могут представлять собой аминокислотную замену на любой другой из (вплоть до) 19 других аминокислотных остатков. Вторичную библиотеку можно тестировать, используя анализы и способы, описанные в настоящем документе.

Е. Получение модифицированных полипептидов RN20 и кодирующих их молекул нуклеиновых кислот

Полипептиды модифицированного полипептида RN20, приведенные в настоящем документе, могут быть получены способами очистки и экспрессии рекомбинантных белков, хорошо известными в данной области техники. Полипептиды также могут быть синтезированы химическим путем. Модифицированные формы или варианты, в том числе укороченные формы или варианты, могут быть получены из полипептида дикого типа с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК. Например, модифицированные полипептиды RN20 могут быть получены из полипептида дикого типа, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза.

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды RN20.

Полипептиды могут быть клонированы или выделены любыми доступными способами клонирования и выделения молекул нуклеиновых кислот, известными в данной области техники. Такие способы включают ПЦР амплификацию нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, в том числе скрининг гибридизацией нуклеиновых кислот, скрининг с помощью антител и скрининг по активности. Например, когда полипептиды получают рекомбинантными способами, можно использовать любой способ идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих желаемые гены, известный специалистам в данной области техники. Любой способ, доступный в данной области техники, можно использовать для получения полноразмерной кДНК или ее части (т.е. включающей всю кодирующую область) или клона геномной ДНК, кодирующих RN20, например, из клетки или ткани.

Для выделения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый полипептид, можно использовать способы амплификации нуклеиновых кислот, в том числе, например, способы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Примеры таких способов включают использование амплификатора Perkin-Elmer Cetus и полимеразы Taq (Gene Amp). Материал, содержащий нуклеиновую кислоту, можно использовать в качестве исходного материала, из которого может быть выделена желаемая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид. Например, в способах амплификации можно использовать препараты ДНК и мРНК, экстракты клеток, экстракты тканей, образцы биологических жидкостей (например, кровь, сыворотка, слюна), образцы из здоровых субъектов и/или субъектов, имеющих заболевание. Источник

может относиться к любым эукариотическим видам, включая, но не ограничиваясь ими, позвоночных, млекопитающих, человека, свинью, быка, кошку, птиц, лошадь, собаку и приматов. Библиотеки нуклеиновых кислот также можно использовать в качестве источника исходного материала. Праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать желаемый полипептид. Например, праймеры могут быть сконструированы на основе экспрессируемой последовательности, из которой был получен желаемый полипептид. Праймеры также могут быть сконструированы на основе обратной трансляции аминокислотной последовательности полипептида. При желании для амплификации можно использовать вырожденные праймеры. Олигонуклеотидные праймеры, которые гибридизуются с последовательностями на 3'- и 5'-конце желаемой последовательности, можно использовать в качестве праймеров для амплификации с помощью ПЦР последовательности из образца нуклеиновой кислоты. Праймеры можно использовать для амплификации целого полноразмерного РН20 или его укороченной последовательности, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая любые предусмотренные в настоящем документе растворимые полипептиды РН20. Молекулы нуклеиновых кислот, полученные амплификацией, могут быть секвенированы, чтобы подтвердить, что они кодируют желаемый полипептид.

К молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, могут быть присоединены дополнительные нуклеотидные последовательности, в том числе линкерные последовательности, содержащие сайты эндонуклеаз рестрикции, чтобы клонировать синтетический ген в вектор, например вектор экспрессии белка или вектор, сконструированный для амплификации коровой последовательности ДНК, кодирующей белок. Более того, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, могут быть функционально связаны дополнительные нуклеотидные последовательности, определяющие функциональные элементы ДНК. Примеры таких последовательностей включают, но не ограничиваются ими, последовательности промоторов, сконструированные таким образом, чтобы способствовать внутриклеточной экспрессии белка, и последовательности секреции, например гетерологичные сигнальные последовательности, сконструированные таким образом, чтобы способствовать секреции белка. Такие последовательности известны специалистам в данной области техники. Например, примеры гетерологичных сигнальных последовательностей включают гетерологичные сигнальные последовательности IgG каппа человека и мыши, приведенные в SEQ ID NO: 868, но не ограничиваются ими. Дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющие области связывания белка, также могут быть связаны с молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих фермент. Такие области включают, но не ограничиваются ими, последовательности остатков, которые способствуют захвату фермента конкретными клетками-мишенями, или иным образом изменяют фармакокинетику продукта синтетического гена, или которые кодируют белки, которые способствуют захвату фермента конкретными клетками-мишенями, или иным образом изменяют фармакокинетику продукта синтетического гена.

Кроме того, могут быть добавлены метки или другие фрагменты, например, чтобы облегчить обнаружение или аффинную очистку полипептида. Например, с молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих фермент, также могут быть связаны дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющие эпитопную метку или другой обнаруживаемый маркер. Примеры таких последовательностей включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие His-метку или Flag-метку.

Идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в соответствующий клонирующий вектор. Можно использовать большое количество систем вектор-хозяин, известных в данной области техники. Возможные векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды или модифицированные вирусы, но векторная система должна быть совместима с используемой клеткой-хозяином. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, бактериофаги, такие как производные бактериофага лямбда, или плазмиды, такие как pCMV4, pBR322 или производные плазмиды pUC, или вектор Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Другие векторы экспрессии включают вектор экспрессии HZ24, приведенный в настоящем документе в качестве примера (см., например, SEQ ID NOS:4 и 5). Вставку в клонирующий вектор можно осуществить, например, лигированием фрагмента ДНК с комплементарными липкими концами клонирующего вектора. Вставку можно осуществить с использованием клонирующих векторов ТОРО (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Если в клонирующем векторе отсутствуют комплементарные сайты рестрикции, используемые для фрагментации ДНК, концы молекул ДНК могут быть модифицированы ферментативным путем. Альтернативно, любой желаемый сайт можно получить лигированием последовательностей нуклеотидов (линкеров) с концами ДНК; эти лигированные линкеры могут содержать специфические олигонуклеотиды, синтезированные химическим путем и кодирующие последовательности узнавания эндонуклеаз рестрикции. В альтернативном способе расщепляемый вектор и ген белка могут быть модифицированы гомополимерными хвостами.

Рекомбинантные молекулы могут быть введены в клетки-хозяева, например, посредством трансформации, трансфекции, электропорации и сонопорации, таким образом, что получается много копий последовательности гена. В определенных вариантах воплощения с помощью трансформации клеток-хозяев молекулами рекомбинантной ДНК, которые включают выделенный ген белка, кДНК или

синтезированную последовательность ДНК, можно получить множество копий гена. Таким образом, ген можно получить в большом количестве, выращивая трансформанты, выделяя молекулы рекомбинантной ДНК из трансформантов и, при необходимости, извлекая вставленный ген из выделенной рекомбинантной ДНК.

В дополнение к рекомбинантной продукции предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 могут быть получены прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных методов (см., например, Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J. (1963) *J. Am Chem Soc.*, 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* можно осуществить вручную или с использованием автоматизации. Автоматизированный синтез можно осуществить, например, с использованием синтезатора Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City CA) в соответствии с инструкциями, предусмотренными производителем. Различные фрагменты полипептида можно синтезировать химическим путем отдельно и скомбинировать с помощью химических способов.

2. Получение мутантных или модифицированных нуклеиновых кислот и кодируемых полипептидов.

Предусмотренные в настоящем документе модификации можно осуществить с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, таких как обычные для специалистов в данной области техники. Можно использовать любой способ осуществления мутации любой одной или нескольких аминокислот в целевом белке, известный в данной области техники. Способы включают стандартный сайт-направленный мутагенез (с использованием, например, набора, такого как набор QuikChange, доступный из Stratagene) кодирующих молекул нуклеиновых кислот, или способы твердофазного полипептидного синтеза.

3. Векторы и клетки.

Для рекомбинантной экспрессии одного или более желаемых белков, таких как любой описанный здесь модифицированный полипептид РН20, нуклеиновая кислота, содержащая всю нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, или ее часть, может быть вставлена в соответствующий экспрессионный вектор, т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроеной кодирующей последовательности белка. Необходимые сигналы транскрипции и трансляции также могут содержаться в нативном промоторе гена фермента и/или его фланкирующих участках.

Также предусмотрены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент. Также предусмотрены клетки, содержащие векторы. Клетки включают эукариотические и прокариотические клетки, а векторы включают в себя любые подходящие векторы для применения в этих клетках. Как правило, клетка представляет собой клетку, способную осуществлять гликозилирование закодированного белка.

Предусмотрены прокариотические и эукариотические клетки, содержащие векторы. Такие клетки включают бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки грибов, архей, растительные клетки, клетки насекомых и клетки животных. Такие клетки используют для получения белка путем выращивания вышеописанных клеток в условиях, при которых кодируемый белок экспрессируется в клетке, и затем из этих клеток выделяют экспрессированный белок. Например, для целей данного изобретения фермент может быть секретирован в среду.

Штамм клеток-хозяев можно выбрать по его способности модулировать экспрессию вставленной последовательности или процессировать экспрессируемый белок желаемым образом. Такие модификации полипептида включают ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, присоединение липидов и ацилирование, но не ограничиваются ими. Посттрансляционный процессинг может влиять на фолдинг и/или функцию полипептида. Различные клетки-хозяева, включая, но не ограничиваясь ими, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 и WI38 имеют специальный клеточный аппарат и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей, и они могут быть выбраны, чтобы обеспечить правильное модифицирование и процессинг введенного белка. Обычно выбирают клетку, в которой может осуществляться N-гликозилирование экспрессируемого полипептида. Таким образом, предусмотрены эукариотические клетки, содержащие векторы. Примерами эукариотических клеток являются клетки млекопитающих, а именно клетки яичника китайского хомячка (CHO). Например, для получения предусмотренных в настоящем документе полипептидов используют клетки CHO дефицитные по дигидрофолат редуктазе (например, клетки DG44). Следует отметить, что бактериальная экспрессия предусмотренного в настоящем документе полипептида РН20 не приведет к каталитически активному полипептиду, но в комбинации с надлежащей системой гликозилирования РН20 может быть гликозилирован искусственно.

Предусмотрены векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует модифицированный полипептид РН20, соединенный с нативной или гетерологичной сигнальной последовательностью, а также их множественные копии. Векторы могут быть выбраны для экспрессии белка фермента в клетке или экспрессии фермента в виде секретлируемого белка.

Для экспрессии последовательности, кодирующей белок могут быть использованы разнообразные системы вектор-хозяин. Они включают, но не ограничиваются ими, системы клеток млекопитающих,

инфицированных вирусом (например, вирусом коровьей оспы, аденовирусом и другими вирусами); системы клеток насекомых, инфицированных вирусом (например, бакуловирусом); микроорганизмы, такие как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы, или бактерии, трансформированные ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Элементы экспрессионных векторов различаются по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой системы вектор-хозяин может быть использован любой из ряда подходящих элементов транскрипции и трансляции.

Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих химерный ген с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции и последовательностями, кодирующими белок, могут быть использованы любые известные специалистам в данной области способы вставки фрагментов ДНК в вектор. Эти способы могут включать способы получения рекомбинантной ДНК *in vitro* и синтетические подходы, и рекомбинацию *in vivo* (генетическая рекомбинация). Экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок или домены, производные, фрагменты или их гомологи, можно регулировать с помощью второй последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что гены или их фрагменты экспрессируются в хозяине, трансформированном рекомбинантной молекулой (молекулами) ДНК. Например, экспрессией белков можно управлять с помощью любого промотора/энхансера, известного в данной области. В конкретном варианте промотор не является нативным для гена интересующего белка. Промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, ранний промотор SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)), промотор, содержащийся в 3' длинном конечном повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al. *Cell*. 22:787-797 (1980)), промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)), регуляторные последовательности гена металлотioneина (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)); прокариотические экспрессионные векторы содержат промотор β -лактамазы (Jay et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5543) или *tac*-промотор (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)); см. также "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in *Scientific American* 242:79-94 (1980); экспрессионные векторы растений содержат промотор нопалин-синтетазы (Herrera-Estrella et al., *Nature* 303:209-213 (1984)) или промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (Gardner et al., *Nucleic Acids Res.* 9:2871 (1981)) и промотор фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Herrera-Estrella et al., *Nature* 310:115-120 (1984)); промоторные элементы из дрожжей и других грибов включают промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор фосфоглицераткиназы, промотор щелочной фосфатазы, в трансгенных животных были использованы следующие участки контроля транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность: регуляторный участок гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., *Cell*. 38:639-646 (1984); Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); регуляторный участок гена инсулина, который активен в β -клетках поджелудочной железы (Hanahan et al., *Nature* 315:115-122 (1985)), регуляторный участок гена иммуноглобулина, который активен в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., *Cell*. 38:647-658 (1984); Adams et al., *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444 (1987)), контрольный участок вируса опухоли молочной железы мыши, который активен в яичке, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., *Cell*. 45:485-495 (1986)), участок контроля гена альбумина, который активен в печени (Pinkert et al., *Genes and Devel.* 1:268-276 (1987)), регуляторный участок гена α -фетопротеина, который активен в печени (Krumlauf et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., *Science* 235:53-58 (1987)), участок контроля гена α -1 антитрипсина, который активен в печени (Kelsey et al., *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987)), регуляторный участок контроля гена β -глобулина, который активен в миелоидных клетках (Magram et al., *Nature* 315:338-340 (1985); Kollias et al., *Cell*. 46:89-94 (1986)), регуляторный участок контроля гена основного белка миелина, который активен в олигодендронитах мозга (Readhead et al., *Cell*. 48:703-712 (1987)), участок контроля гена лёгких цепей миозина 2, который активен в скелетных мышцах (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985)) и контрольный участок гена гонадотропного рилизинг-гормона, который активен в гонадотропных клетках гипоталамуса (Mason et al., *Science* 234:1372-1378 (1986)).

В одном варианте воплощения используется вектор, содержащий промотор, функционально связанный с нуклеиновыми кислотами, кодирующими желаемый белок, или его домен, фрагмент, производное или гомолог, одну или несколько точек начала репликации, и, необязательно, один или несколько маркеров для селекции (например, ген устойчивости к антибиотику). В зависимости от экспрессирующей системы для эффективной трансляции последовательности РН20 также требуются определенные сигналы инициации. Эти сигналы включают иницирующий кодон АТГ и прилегающие последовательности. В тех случаях, когда иницирующий кодон и вышележащие последовательности РН20 или его растворимых форм вставлены в соответствующий вектор экспрессии, не требуются дополнительные сигналы контроля трансляции. В тех случаях, когда вставлена только кодирующая последовательность, или ее часть, должны быть предусмотрены экзогенные сигналы контроля транскрипции, в том числе, иницирующий кодон АТГ. Более того, иницирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания для осуществления транскрипции всей вставки. Экзогенные транскрипционные элементы и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение как природное, так и синтетическое. Эффективность экс-

пресии можно увеличить за счет вставки энхансеров, соответствующих используемым клеточным системам (Scharf et al. (1994) *Results Probl. Cell. Differ* 20:125-62; Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol*, 153:516-544).

Примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pQE (доступные в Qiagen, Valencia, CA, см. также опубликованную литературу Qiagen по описанию системы). pQE векторы имеют промотор фага T5 (узнаваемый РНК-полимеразой *E. coli*) и удвоенный модуль репрессии lac-оператора, что обеспечивает жестко регулируемую экспрессию рекомбинантных белков в *E.coli* на высоком уровне, также векторы включают синтетический сайт связывания рибосомы (RBS II) для эффективной трансляции, кодирующую 6xHis-метку последовательность, терминаторы транскрипции t0 и T1, точку начала репликации ColE1 и ген β -лактамазы для устойчивости к ампициллину. Векторы pQE позволяют размещать 6xHis-метку на N- или C-конце рекомбинантного белка. Такие плазмиды включают pQE 32, pQE 30 и pQE 31, которые имеют сайты множественного клонирования для всех трех рамок считывания и обеспечивают экспрессию 6xHis-меченных с N-конца белков. Другие примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pET (см. патент США 4952496; доступны от Novagen, Madison, WI; см. также опубликованную литературу Novagen с описанием системы). Такие плазмиды включают pET 11a, которая содержит промотор T7lac, T7 терминатор, индуцируемый lac-оператор *E.coli* и ген lac-репрессора; pET 12a-c, которая содержит T7 промотор, терминатор T7 и секреторный сигнал OmpT *E.coli*; и pET 15b, и pET19b (Novagen, Madison, WI), которые содержат лидерную последовательность His-Tag™ для применения при очистке на специфичной к His колонке и сайт расщепления тромбином, который обеспечивает расщепление после очистки на колонке, T7-lac промоторный участок и T7 терминатор.

Как правило, векторы могут представлять собой плазмиды, вирусные векторы или другие векторы, известные в данной области техники, используемые для экспрессии модифицированного полипептида PH20 *in vivo* или *in vitro*. Например, модифицированный полипептид PH20 экспрессируют в клетках млекопитающих, в том числе, например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Примером вектора для экспрессии в клетках млекопитающих является вектор экспрессии HZ24.

Экспрессионный вектор HZ24 был получен из векторной конструкции pC1 (Promega). Он содержит участки ДНК, кодирующие ген β -лактамазы для устойчивости к антибиотику (AmpR), точку начала репликации F1, немедленный-ранний энхансер/промотор цитомегаловируса (CMV) и поздний сигнал полиаденилирования SV40 (SV40). Вектор экспрессии также имеет внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) вируса ЕСMV (Clontech) и ген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR).

Можно использовать вирусные векторы, такие как аденовирусные, ретровирусные векторы или векторы на основе вируса осповакцины. В некоторых примерах вектор представляет собой дефектный или ослабленный ретровирусный или другой вирусный вектор (см., патент США № 4980286). Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)). Эти ретровирусные векторы могут быть модифицированы для удаления ретровирусной последовательности, которая не является необходимой для упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина.

В некоторых примерах вирусы могут быть усилены нуклеиновой кислотой, которая кодирует модифицированный полипептид PH20, что может способствовать их репликации и распространению в ткани-мишени. Например, тканью-мишенью может быть раковая ткань, при этом вирус может селективно реплицироваться в опухоли. Вирус также может представлять собой нелитический вирус, где вирус селективно реплицируется под контролем тканеспецифичного промотора. При репликации вируса совместная экспрессия полипептида PH20 с вирусными генами увеличит распространение вируса *in vivo*.

4. Экспрессия.

Модифицированные полипептиды PH20 могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области, включая способы *in vivo* и *in vitro*. Интересующие белки могут быть экспрессированы в любом организме, подходящем для получения требуемого количества и требуемой формы белков, например, необходимых для введения и лечения. Экспрессионные организмы включают прокариотические и эукариотические организмы, такие как *E.coli*, дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих, в том числе клеточные линии человека, и трансгенных животных. Экспрессионные организмы могут отличаться по уровню продукции белков, а также типам посттрансляционных модификаций, которые присутствуют на экспрессированных белках. Выбор экспрессионного организма может быть сделан на основе этих и других факторов, таких как соображения нормативного регулирования и безопасности, себестоимости и необходимости и методов очистки.

Специалистам в данной области доступны и известны многие экспрессионные векторы, которые могут быть использованы для экспрессии белков. Выбор экспрессионного вектора будет зависеть от выбора хозяина системы экспрессии. В целом, экспрессионные векторы могут включать транскрипционные промоторы и, необязательно, энхансеры, сигналы трансляции, сигналы терминации транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, используемые для стабильной трансформации, обычно имеют селективный маркер, который обеспечивает селекцию и поддержание трансформированных клеток. В некоторых случаях для амплификации числа копий вектора могут быть использованы точки начала реп-

ликации.

Модифицированные полипептиды PH20 могут также быть использованы или экспрессированы в виде слитых белков. Например, слитый фермент может быть получен путём добавления дополнительно функционального участка. Примеры слитых белков-ферментов включают, но не ограничиваются ими, белки, слитые с сигнальными последовательностями, например сигналами локализации, например, 6xHis или His6-меткой или тус-меткой, или последовательностями для очистки, например, слитые с GST, и последовательностью для направления секреции белка и/или ассоциации с мембраной.

Для длительной и высокопроизводительной продукции рекомбинантных белков желательна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют модифицированный полипептид PH20, могут быть трансформированы с использованием векторов, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективируемого маркера. После введения вектора перед тем как перенести клетки на селективную среду, их растят 1-2 дня на обогащенной среде. Селективируемый маркер придает устойчивость к селекции, и при его наличии растут и сохраняются клетки, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Устойчивые клетки стабильно трансформированных клеток можно размножать с использованием методов культуры ткани, подходящих для этих типов клеток.

Для выделения трансформированных клеточных линий может быть использовано любое число систем селекции. Они включают, но не ограничиваются ими, гены тимидин киназы вируса простого герпеса (Wigler, M et al. (1977) *Cell.*, 11:223-32) и аденин фосфорибозилтрансферазы (Lowy, I et al. (1980) *Cell.*, 22:817-23), которые можно использовать в ТК- или APRT- клетках соответственно. Также в качестве основы для отбора можно использовать устойчивость к антиметаболиту, антибиотику или гербициду. Например, можно использовать DHFR, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:3567-70); npt, который придает устойчивость к аминогликозидам неомицину и G-418 (Colbere-Garapin, F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.*, 150:1-14); и als или pat, которые придают устойчивость к хлорсульфурону и фосфинотрицин ацетилтрансферазу соответственно. Были описаны дополнительные гены для селекции, например, trpB, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (Hartman S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8047-51). Визуальные маркеры, включая, но не ограничиваясь ими, антоцианы, β -глюкуронидаза и ее субстраты, GUS, и люцифераза и ее субстрат люциферин также можно использовать для идентификации трансформантов и также для количественного определения временной или стабильной экспрессии белка, опосредуемой конкретной векторной системой (Rhodes C.A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Наличие и экспрессию полипептидов PH20 можно контролировать. Например, обнаружить функциональный полипептид можно, тестируя кондиционированную среду на энзиматическую активность гиалуронидазы в соответствующих условиях. Примеры анализов для оценки растворимости и активности экспрессируемых белков описаны в настоящем документе.

а) Прокариотические клетки.

Прокариоты, особенно *E. coli*, обеспечивают систему для получения больших количеств белка. Трансформация *E. coli* является простым и быстрым способом, хорошо известным специалистам в данной области. Экспрессионные векторы для *E. coli* могут содержать индуцируемые промоторы, которые включают промоторы, которые являются удобными для индуцирования высоких уровней экспрессии белка и для экспрессии белков, которые проявляют некоторую токсичность для клеток-хозяев. Примеры индуцируемых промоторов включают lac-промотор, trp-промотор, гибридный tac-промотор, промоторы T7 и SP6 PHK и регулируемый температурой APL-промотор.

Белки, такие как любой указанный здесь белок, могут быть экспрессированы в цитоплазме *E. coli*. Цитоплазма является восстановительной средой, и для некоторых молекул это может стать причиной образования нерастворимых телец включения. Восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол и β -меркаптоэтанол, и денатурирующие агенты, такие как гуанидин-HCl и мочевины, могут быть использованы для восстановления растворимости белков. Альтернативный подход состоит в экспрессии белков в периплазматическом пространстве бактерий, которое является окислительной средой и содержит шаперонинподобные белки и дисульфидизомеразы, что может привести к образованию растворимого белка. Как правило, чтобы направить экспрессию белка в периплазму, с белком сливают лидерную последовательность. Лидерная последовательность затем удаляется сигнальными пептидазами внутри периплазмы. Примеры периплазматических лидерных последовательностей включают лидер *relB* гена пектат-лиазы и лидер, полученный из гена щелочной фосфатазы. В некоторых случаях периплазматическая экспрессия приводит к утечке экспрессированного белка в культуральную среду. Секреция белков обеспечивает быструю и простую очистку от культурального супернатанта. Белки, которые не секретируются, могут быть получены из периплазмы после осмотического лизиса. Подобно цитоплазматической экспрессии в некоторых случаях белки могут стать нерастворимыми, и денатурирующие и восстанавливающие агенты могут быть использованы, чтобы способствовать растворению и ренатурации. Температура индукции и роста также может влиять на уровни экспрессии и растворимость, как правило, используется интервал

температур между 25 и 37°C. Как правило, бактерии производят агликозилированные белки. Таким образом, если белки требуют гликозилирования для выполнения своей функции, гликозилирование может быть осуществлено *in vitro* после очистки из клеток-хозяев.

b) Дрожжевые клетки.

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Pichia pastoris*, являются хорошо известными экспрессионными организмами, которые могут быть использованы для получения белков, таких как любой из описанных в настоящем документе белков. Дрожжи можно трансформировать эписомальными реплицирующимися векторами или путем стабильной хромосомной интеграции методом гомологичной рекомбинации. Как правило, для регулирования экспрессии генов используют индуцируемые промоторы. Примеры таких промоторов включают *GAL1*, *GAL7* и *GAL5* и промоторы металлотioneина, такие как *CUP1*, *AOX1* или другие промоторы *Pichia* или других дрожжей. Экспрессионные векторы часто включают селективируемый маркер, такой как *LEU2*, *TRP1*, *HIS3* и *URA3* для отбора и поддержания трансформированной ДНК. Белки, экспрессируемые в дрожжах, часто являются растворимыми. Совместная экспрессия с шаперонинами, такими как *Вір*, и протеин-дисульфидизомеразой, может улучшить уровни экспрессии и растворимость. Кроме того, белки, экспрессируемые в дрожжах, могут быть направленно секретированы с помощью слияния с сигнальным секреторным пептидом, таким как секреторный сигнал дрожжевого фактора спаривания α *Saccharomyces cerevisiae*, и слияния с поверхностными белками клетки дрожжей, такими как рецептор адгезии спаривания *Aga2p* или глюкоамилаза *Argula adeninivorans*. Чтобы затем удалить слитые последовательности от экспрессируемых полипептидов, когда они выходят из секреторного пути, может быть добавлен сайт расщепления протеазой, как, например, протеазой *Kex-2*. Дрожжи также способны к гликозилированию по *Asn-X-Ser/Thr* мотивам.

с) Насекомые и клетки насекомых.

Клетки насекомых, в частности система бакуловирусной экспрессии, полезны для экспрессии полипептидов, таких как полипептиды *РН20*. Клетки насекомых экспрессируют высокие уровни белка и способны к большинству посттрансляционных модификаций, используемых высшими эукариотами. Бакуловирусы имеют ограниченный круг хозяев, что повышает безопасность и снижает нормативные требования к эукариотической экспрессии. Типичные векторы экспрессии используют промотор для экспрессии высокого уровня белка, такой как промотор полиэдрина бакуловируса. Обычно используемые бакуловирусные системы включают бакуловирусы, такие как вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (*AcNPV*) и вирус ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (*BmNPV*), и клеточные линии насекомых, такие как *Sf9*, полученные из *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (*A7S*) и *Danaus plexippus* (*DpN1*). Для высокого уровня экспрессии нуклеотидная последовательность экспрессируемой молекулы должна быть вставлена непосредственно после инициаторного кодона полиэдрина вируса. Сигналы секреции млекопитающих точно процессируются в клетках насекомых и могут быть использованы для секреции экспрессируемого белка в культуральную среду. Кроме того, клеточные линии *Pseudaletia unipuncta* (*A7S*) и *Danaus plexippus* (*DpN1*) продуцируют белки с гликозилированием, аналогичным таковому в клеточных системах млекопитающих. Примером клеток насекомых являются клетки насекомых, которые были модифицированы для снижения иммуногенности, включая клетки с "маммализированными" бакуловирусными экспрессионными векторами и клетки, в которых отсутствует фермент *FT3*.

В качестве альтернативной системы экспрессии в клетках насекомых используются стабильно трансформированные клетки. Для экспрессии могут быть использованы клеточные линии, такие как *Schneider 2* (*S2*), *Kc* (*Drosophila melanogaster*) и *C7* (*Aedes albopictus*). Промотор металлотioneина дрозофилы может быть использован, чтобы обеспечивать высокие уровни экспрессии при индукции тяжелыми металлами кадмием или медью. Векторы экспрессии обычно поддерживают с помощью селективных маркеров, таких как неомицин и гигромицин.

d) Клетки млекопитающих.

Системы экспрессии млекопитающих могут быть использованы для экспрессии белков, в том числе полипептидов *РН20*. Экспрессионные конструкции могут быть доставлены в клетки млекопитающих путём вирусной инфекции, такой как аденовирусная инфекция, или путем прямого переноса ДНК, например, с помощью липосом, фосфата кальция, *DEAE*-декстрана и физических способов, таких как электропорация и микроинъекция. Экспрессионные векторы для клеток млекопитающих, как правило, включают в себя сайт эспирования мРНК, *TATA*-бокс, последовательность инициации трансляции (консенсусная последовательность *Козака*) и сигналы полиаденилирования. Чтобы обеспечить бицистронную экспрессию другого гена, например селективного маркера, также могут быть добавлены *IRES* элементы. Такие векторы часто включают промоторы-энхансеры транскрипции для высокого уровня экспрессии, например промотор-энхансер *SV40*, промотор цитомегаловируса человека (*CMV*) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (*RSV*). Эти промоторы-энхансеры активны во многих типах клеток. Тканеспецифичные и клеточно-специфичные промоторные и энхансерные участки также могут быть использованы для экспрессии. Примеры участков промотора/энхансера включают, но не ограничиваются ими, последовательности из генов, таких как гены эластазы I, инсулина, иммуноглобулина, вируса опу-

холи молочной железы мыши, альбумина, α -фетопротеина, α -1-антитрипсина, β -глобина, основного белка миелина, легкой цепи миозина 2 и гена контроля рилизинг-фактора гонадотропного гормона. Для отбора и поддержания клеток с экспрессионной конструкцией могут быть использованы селективные маркеры. Примеры селективных маркерных генов включают, но не ограничиваются ими, гены гигромицин-В-фосфотрансферазы, аденозиндезаминазы, ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, аминоклидфосфотрансферазы, дигидрофолатредуктазы (DHFR) и тимидинкиназы. Например, экспрессия может быть осуществлена в присутствии метотрексата для селекции только тех клеток, которые экспрессируют ген DHFR. Слияние с сигнальными молекулами клеточной поверхности, такими как TCR- ζ и Fc ϵ RI- γ , может направить экспрессию белков в активном состоянии на поверхности клетки.

Для экспрессии в клетках млекопитающих подходят многие клеточные линии, в том числе клеточные линии мыши, крысы, человека, обезьяны, курицы и хомяка. Типичные клеточные линии включают, но не ограничиваются таковыми, CHO, HeLa, Balb/3T3, MT2, мышинные NS0 (не секретизирующие) и другие линии клеток миеломы, гибридомные и гетерогибридомные клеточные линии, лимфоциты, фибробласты, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 и НКВ. Доступны также клеточные линии, адаптированные к бессывороточной среде, что облегчает очистку секретируемых белков из клеточной культуральной среды. Примеры включают клетки CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat#11619-012) и бессывороточную клеточную линию EBNA-1 (Pham et al., (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84:332-42). Также доступны клеточные линии, которые способны расти в специальных средах, оптимизированных для максимальной экспрессии. Например, клетки DG44 CHO приспособлены расти в суспензионной культуре в химически полученной среде без животных компонентов.

е) Растения.

Трансгенные растительные клетки и растения могут быть использованы для экспрессии белков, таких как любой из описанных здесь белков. Экспрессионные конструкции, как правило, вводят в растения с применением прямого переноса ДНК, например, бомбардировкой микрочастицами и ПЭГ-опосредованной передачей в протопласты, и агробактериальной трансформацией. Экспрессионные векторы могут включать промотор и энхансер, элементы терминации транскрипции и элементы контроля трансляции. Экспрессионные векторы и способы трансформации, как правило, различаются для двудольных растений-хозяев, таких как *Arabidopsis* и табак, и для однодольных растений-хозяев, таких как кукуруза и рис. Примеры промоторов растений, используемых для экспрессии, включают промотор вируса мозаики цветной капусты, промотор нопалин-синтазы, промотор рибулозобисфосфаткарбоксилазы и промоторы убиквитина и UBQ3. Селективные маркеры, такие как гены гигромицина, фосфоманнозоизомеразы и неомицинфосфотрансферазы, часто используются для облегчения селекции и поддержания трансформированных клеток. Трансформированные растительные клетки можно поддерживать в культуре клеток, в виде агрегатов (каллусная ткань), и регенерировать в целые растения. Трансгенные растительные клетки могут также включать водоросли, разработанные для получения полипептида гиалуронидазы. Поскольку растения имеют типы гликозилирования, отличающиеся от таковых в клетках млекопитающих, это может повлиять на выбор получения белка в этих организмах.

5. Очистка.

Клетки-хозяева, трансформированные последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид РН20, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и выделения кодируемого белка из культуры клеток. Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, обычно является секретизируемым, но может содержаться внутри клеток в зависимости от последовательности и/или используемого вектора. Как будет понятно специалистам в данной области техники, векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую РН20, могут быть сконструированы с сигнальной последовательностью, которая способствует прямой секреции РН20 через мембраны прокариотических или эукариотических клеток.

Способ очистки полипептидов из клеток-хозяев, будет зависеть от выбранных клеток-хозяев и систем экспрессии. В случае секретизируемых молекул белки, как правило, очищают от культуральной среды после удаления клеток. При внутриклеточной экспрессии клетки могут быть лизированы, а белки очищены из экстракта. Когда для экспрессии используют трансгенные организмы, такие как трансгенные растения и животные, то в качестве исходного материала, чтобы подготовить лизированный экстракт клеток, могут быть использованы ткани или органы. Кроме того, получение белка в трансгенных животных может включать получение полипептидов в молоке или яйцах, которые могут быть собраны и, если необходимо, белки могут быть извлечены и дополнительно очищены с применением стандартных методов, известных в данной области.

Белки, такие как модифицированные полипептиды РН20, могут быть очищены стандартными методами очистки белка, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, SDS-PAGE, фракционированием по размеру и эксклюзионной хроматографией, фракционированием сульфатом аммония и ионообменной хроматографией, такой как анионообменная хроматография. Методы аффинной очистки также можно использовать для повышения эффективности и чистоты препаратов. Например, в аффинной очистке можно использовать антитела, рецепторы и другие молекулы, которые свя-

зываются с ферментами гиалуронидазами RH20. Например, растворимый RH20 может быть очищен из кондиционированной среды.

Экспрессирующие конструкции также можно сконструировать таким образом, что белок будет дополнительно содержать аффинную метку, такую как тус эпитоп, слитую последовательность GST или His₆, и его можно будет подвергать аффинной очистке с помощью антитела тус, смолы с глутатионом или Ni-смолы соответственно. Такие метки могут быть присоединены к нуклеотидной последовательности, кодирующей растворимый RH20, как описано в настоящем документе, и они могут облегчать очистку растворимых белков. Например, модифицированный полипептид RH20 может быть экспрессирован в виде рекомбинантного белка с одним или несколькими дополнительными полипептидными доменами, добавленными, чтобы облегчить очистку белка. Такие домены, облегчающие очистку, включают, но не ограничиваются ими, металл-хелатирующие пептиды, такие как гистидин-триптофановые модули, которые делают возможным очистку на иммобилизованных металлах, домены белка А, которые делают возможным очистку на иммобилизованном иммуноглобулине, и домен, используемый в системе последовательность FLAGS/аффинная очистка (1 mM unex Corp., Seattle Wash.). Чтобы облегчить очистку, используют включение расщепляемой линкерной последовательности, например последовательности, расщепляемой фактором ХА или энтерокиназой (Invitrogen, San Diego, CA), между доменом очистки и экспрессируемым полипептидом RH20. Один такой вектор экспрессии предусмотрен для экспрессии белка слияния, содержащего полипептид RH20 и сайт расщепления энтерокиназой. Остатки гистидина облегчают очистку на ИМАС (аффинная хроматография с иммобилизованным металлом), тогда как сайт расщепления энтерокиназой обеспечивает способ очистки полипептида из белка слияния.

Чистоту можно оценить любым способом, известным в данной области техники, в том числе гель-электрофорезом, способами ВЭЖХ, окрашиванием и спектрофотометрическими методами. Экспрессируемый и очищенный белок можно проанализировать с использованием любого анализа или способа, известного специалисту в данной области техники, например любого описанного в разделе G. Они включают виды анализов, основанные на физических и/или функциональных свойствах белка, включая, но не ограничиваясь ими, анализ с помощью гель-электрофореза, иммунологический анализ и анализы гиалуронидазной активности.

В зависимости от используемых систем экспрессии и клеток-хозяев полученный полипептид может быть гетерогенным вследствие наличия пептидаз в культуральной среде при продукции и очистке. Например, при получении растворимого RH20 в культивируемых клетках СНО может получиться смесь гетерогенных полипептидов.

6. Модификации полипептидов пегилированием.

Полиэтиленгликоль (PEG) широко используется в биоматериалах, биотехнологии и медицине в первую очередь потому, что PEG является биосовместимым, нетоксичным, водорастворимым полимером, который, как правило, является неиммуногенным (Zhao and Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). В области доставки лекарственных средств PEG-производные широко используются при ковалентном присоединении PEG (т.е. "ПЭГилировании" (пегилировании)) к белкам с целью снижения иммуногенности, протеолиза и клиренса в почках и для повышения растворимости (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). Таким же способом PEG присоединяют к низкомолекулярным, относительно гидрофобным препаратам для повышения растворимости, снижения токсичности и изменения биораспределения. Как правило, пегилированные препараты вводят инъекцией в виде растворов.

Близкими применениями являются синтез поперечно-сшитых деградируемых сетей PEG или получение лекарственных форм для использования в доставке лекарственных средств, так как большое количество тех же химических соединений и приемов, используемых для создания деградируемых, растворимых носителей лекарственных средств, также может быть использовано для создания деградируемых гелей (Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993). Кроме того, известно, что межмолекулярные комплексы могут быть образованы путем смешивания растворов двух комплементарных полимеров. Такие комплексы, как правило, стабилизируются электростатическими взаимодействиями (полианион-поликатион) и/или водородными связями (поликислота-полиоснование) между вовлеченными полимерами и/или гидрофобными взаимодействиями между полимерами и водным окружением (Krupers et al., Eur. Polym J. 32:785-790, 1996). Например, смешивание растворов полиакриловой кислоты (РААс) и полиэтиленоксида (PEO) при надлежащих условиях приводит к образованию комплексов, основанных, главным образом, на водородных связях. Диссоциация этих комплексов в физиологических условиях была использована для доставки не модифицированных лекарственных средств (т.е. не пегилированных). Кроме того, комплексы комплементарных полимеров могут формироваться из гомополимеров и сополимеров.

Многочисленные реагенты для пегилирования были описаны в данной области. Такие реагенты включают, но не ограничиваются ими, активированный N-гидроксисукцинимидом (NHS) PEG, сукцинимидил mPEG, mPEG2-N-гидроксисукцинимид, mPEG сукцинимидил α -метилбутаноат, mPEG сукцинимидилпропионат, mPEG сукцинимидилбутаноат, сукцинимидиловый эфир mPEG карбоксиметил 3-гидроксибутановой кислоты, гомобифункциональный PEG-сукцинимидилпропионат, гомобифункциональный PEG-пропиональдегид, гомобифункциональный PEG-бутиральдегид, PEG-малеимид, PEG-

гидразид, паранитрофенил-карбонат PEG, mPEG-бензотриазол карбонат, пропиональдегид PEG, MPEG бутиральдегид, разветвленный mPEG2 бутиральдегид, MPEG ацетил, MPEG пиперидон, MPEG метилкетон, mPEG малеимид "без линкера", MPEG-винилсульфон, MPEG-тиол, MPEG-ортопиридилтиоэфир, MPEG-ортопиридил дисульфид, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, винилсульфон PEG-NHS, акрилат PEG-NHS, флуоресцеин PEG-NHS и биотин PEG-NHS (см., например, Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese et al., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; US 5672662; US 5932462; US 6495659; US 6737505; US 4002531; US 4179337; US 5122614; US 5324844; US 5446090; US 5612460; US 5643575; US 5766581; US 5795569; US 5808096; US 5900461; US 5919455; US 5985263; US 5990237; US 6113906; US 6214966; US 6258351; US 6340742; US 6413507; US 6420339; US 6437025; US 6448369; US 6461802; US 6828401; US 6858736; US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; US 2005/0114037; US 2005/0171328; US 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 0500360; WO 9428024 и WO 0187925).

В одном примере полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 до примерно 50 кДа и обычно от примерно 5 до примерно 30 кДа. Ковалентное присоединение PEG к препарату (известное как "ПЭГилирование" (пегилирование)) может быть осуществлено известными методами химического синтеза. Например, пегилирование белка может быть осуществлено путем взаимодействия NHS-активированного PEG с белком при соответствующих условиях реакции.

Несмотря на то, что было описано множество реакций для присоединения PEG, наиболее широко применяемые из них обладают направленностью, проходят при мягких условиях и не требуют трудоемкой последующей обработки для удаления токсичных катализаторов или побочных продуктов. Например, монометокси PEG (mPEG) имеет только одну реакционноспособную концевую гидроксильную группу, и, таким образом, его применение несколько уменьшает гетерогенность получаемой смеси продукта PEG-белка. Активация гидроксильной группы на конце полимера, противоположном концевой метоксигруппе, чтобы сделать производные PEG более восприимчивыми к нуклеофильной атаке, обычно необходима для достижения эффективного пегилирования белка. Атакующим нуклеофилом обычно является эпсилон-аминогруппа остатка лизина, но и другие амины также могут вступать в реакцию (например, N-концевая α -аминогруппа или аминогруппы в цикле гистидина), если локальные условия являются для этого благоприятными. Более направленное присоединение возможно в белках, содержащих один лизин или цистеин. Последний остаток может быть мишенью PEG-малеимида для тиол-специфической модификации. Кроме того, PEG-гидразид может быть подвергнут взаимодействию с окисленным периодатом деградирующим гиалуронан ферментом с последующим восстановлением в присутствии NaCNBH₃. Для более специфичной реакции пегилированный СМР-углевод может быть подвергнут взаимодействию с деградирующим гиалуронан ферментом в присутствии соответствующих гликозил-трансфераз. В одном из подходов "пегилирования" с полипептидом соединяется множество полимерных молекул. При использовании этого подхода иммунной системе сложнее распознать эпитопы на поверхности полипептида, отвечающие за образование антител, за счёт чего снижается иммунный ответ. Для полипептидов, введенных непосредственно в кровеносную систему человека для получения специфического физиологического эффекта (т.е. фармацевтических препаратов), типичным потенциальным иммунным ответом является ответ IgG и/или IgM, в то время как для полипептидов, которые вдыхают через дыхательную систему (т.е. продуктов промышленности), потенциальной реакцией может быть ответ IgE (т.е. аллергическая реакция). Одна из теорий, объясняющих снижение иммунного ответа, состоит в том, что полимерная молекула (молекулы) экранируют эпитоп (эпитопы) на поверхности полипептида, отвечающие за иммунный ответ, приводящий к образованию антител. Другая теория или, по меньшей мере, фактор, оказывающий частичное влияние, состоит в том, что чем тяжелее конъюгат, тем более снижается иммунный ответ.

Как правило, чтобы получить пегилированные полипептиды PH20, предусмотренные в настоящем описании, фрагменты PEG конъюгируют путём ковалентного присоединения с полипептидами. Способы пегилирования включают, но не ограничиваются таковыми, использование специализированных линкеров и сшивающих химических соединений (see e.g., Roberts, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), присоединение множества фрагментов PEG к единственному сайту конъюгации (например, при использовании разветвленных PEG; см., например, Guiotto et al, *Bioorg. Mek. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-специфическое пегилирование и/или монопегилирование (см., например, Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999) и сайт-направленное ферментативное пегилирование (см., например, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002). Способы и подходы, описанные в данной области, позволяют получать белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 PEG или производных PEG, присоединенных к одной молекуле белка (см., например, US 2006/0104968).

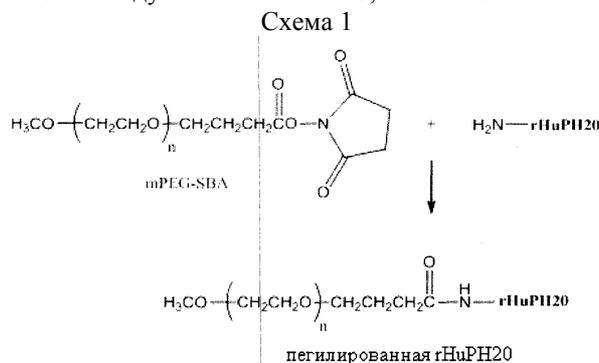
В качестве примера метода получения пегилированных полипептидов PH20 для конъюгирования PEG-фрагментов с гHuPH20 могут быть применены PEG-альдегиды, сукцинимиды и карбонаты, обычно сукцинимидил PEG. Например, гHuPH20 был конъюгирован с примерами сукцинимидил моноPEG (mPEG) реагентов, в том числе mFfEG-сукцинимидилпропионатами (mPEG-SPA), mPEG-

сукцинимидилбутаноатами (mPEG-SBA) и (для присоединения "разветвленного" PEG) с mPEG2-N-гидроксилсукцинимидом. Эти пегелированные сукцинимидиловые эфиры содержат между группой PEG и активированным кросс-сшивающим агентом углеродные цепи различной длины, и содержат единственную или разветвленную группу PEG. Эти различия могут быть использованы, например, для обеспечения различной кинетики реакций и потенциального ограничения сайтов, доступных для присоединения PEG к гHuPH20 в процессе конъюгации.

Сукцинимидил PEG (см. выше), содержащий линейные или разветвленные PEG, может быть конъюгирован с PH20. PEG может использоваться для получения PH20, воспроизводимо содержащего молекулы, имеющие, в среднем, от трёх до шести или примерно от трех до шести молекул PEG на гиалуронидазу. Такие композиции пегелированной гHuPH20 можно легко очистить с получением композиций, имеющих удельную активность гиалуронидазы приблизительно 25000 или 30000 ед/мг белка и практически не содержащих не пегелированной гHuPH20 (менее 5% не пегелированного фермента).

При использовании различных реагентов PEG могут быть получены примеры вариантов пегелированных (полипептидов PH20, например, с помощью mPEG-SBA (30 кДа), mPEG-SMB (30 кДа) и разветвленных вариантов на основе mPEG2-NHS (40 кДа) и mPEG2-NHS (60 кДа). Пегелированные варианты PH20 были получены с использованием реагентов TfHS, а также карбонатов и альдегидов при применении каждого из следующих реагентов: разветвленного mPEG2-NHS-40K, разветвленного mPEG-NHS-10K, разветвленного mPEG-NHS-20K, разветвленного mPEG2-NHS-60K; mPEG-SBA-5K, mPEG-SBA-20K, mPEG-SBA-30K; mPEG-SMB-20K, mPEG-SMB-30K; mPEG-бутиральдегида; mPEG-SPA-20K, mPEG-SPA-30K и PEG-NHS-5K-биотина. Пегелированные PH20 также могут быть получены с применением реагентов PEG, доступных от Dowpharma, подразделение Dow Chemical Corporation; включая полипептиды PH20, пегелированные PEG-паранитрофенилкарбонатом Dowpharma (30 кДа) и PEG-пропиональдегидом (30 кДа).

В одном примере пегелирование включает конъюгацию mPEG-SBA, например mPEG-SBA-30K (имеющего молекулярную массу около 30 кДа) или других сукцинимидиловых эфиров производных PEG бутановой кислоты с полипептидом PH20. Сукцинимидиловые эфиры производных PEG бутановой кислоты, такие как mPEG-SBA-30K, легко присоединяются к аминогруппам белков. Например, ковалентное конъюгирование m-PEG-SBA-30K и гHuPH20 (размер приблизительно 60 кДа) приводит к образованию стабильных амидных связей между гHuPH20 и mPEG, как показано на схеме 1, приведенной ниже.



Как правило, mPEG-SBA-30K или другие PEG добавляют к полипептиду PH20 при молярном соотношении PEO:полипептид 10:1 в соответствующем буфере, например 130 мМ NaCl/10 мМ HEPES, pH 6,8 или в 70 мМ фосфатном буфере, pH 7, с последующей стерилизацией, например, путём стерильной фильтрации, и проводят конъюгацию, например, при перемешивании в течение ночи при 4°C в холодной комнате. В одном примере конъюгированный с PEG-PH20 концентрируют и заменяют буфер.

Другие способы присоединения сукцинимидиловых эфиров производных PEG бутановой кислоты, таких как mPEG-SBA-30K, известны в данной области (см., например, патент US 56726(32; патент US 6737505 и US 2004/0235734). Например, полипептид, такой как полипептид PH20, может быть соединен с активированным NHS производным PEG путём реакции в боратном буфере (0,1 М, pH 8,0) в течение одного часа при 4°C. Полученный пегелированный белок может быть очищен путем ультрафильтрации. Другим способом является реакция полипептида с mPEG-SBA в деионизированной воде, в которую добавляют триэтиламин для повышения pH до 7,2-9. Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение нескольких часов для завершения пегелирования.

Способы пегелирования полипептидов PH20, в том числе, например, гиалуронидаз животного происхождения и бактериальных деградирующих гиалуронан ферментов, известны специалистам в данной области техники. См., например, европейский патент EP 0400472, в котором описывается пегелирование гиалуронидазы из бычьих яиц и хондроитин ABC лиаза. Кроме того, опубликованная заявка США 2006014968 описывает пегелирование человеческой гиалуронидазы, полученной из человеческой PH20. Например, пегелированный деградирующий гиалуронан фермент обычно содержит по меньшей мере три группы PEG на молекулу. Например, деградирующий гиалуронан фермент может иметь молярное соот-

ношение PEG:белок в диапазоне от 5:1 до 9:1, например 7:1.

Ф. Фармацевтические композиции и лекарственные формы, дозирование и введение

В настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции любых модифицированных цолипептидов РН20 для их введения. Фармацевтически приемлемые композиции получают с учетом указаний регулирующих ведомств или других ведомств в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения на животных и на людях. Как правило, из соединений составляют фармацевтические композиции, используя методы и методики, хорошо известные в данной области техники (см., например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126).

В частности, в настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, которые стабильны в виде жидких лекарственных форм в течение продолжительного периода времени, по меньшей мере в течение 1 месяца при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно или в течение по меньшей мере 3 дней при температуре или примерно при температуре от 30 до 42°C включительно. Фармацевтические композиции, в частности жидкие лекарственные формы, могут иметь ограничения, связанные со стабильностью активного агента, который может быть чувствителен к условиям хранения (время или продолжительность хранения, температура и/или перемешивание) и/или компонентам лекарственной формы, которые содержатся в композиции. Таким образом, стабильные фармацевтические композиции обычно содержат модифицированный полипептид РН20, как описано в разделе С.1.б, который обладает повышенной стабильностью, проявляющейся в виде повышенной устойчивости к одному или нескольким условиям, при которых происходит денатурация белка. Такие условия, при которых происходит денатурация белка, могут включать повышенную температуру выше 30°C или равную 30°C или примерно равную 30°C, перемешивание, низкое содержание соли или отсутствие соли и присутствие эксципиентов, но не ограничиваются ими. Повышенная стабильность характеризуется увеличенным временем хранения, пониженной фрагментацией и/или пониженным образованием агрегатов, при этом сохраняется активность активного агента (агентов), например гиалуронидазы РН20. Такие лекарственные формы могут быть предусмотрены в виде "готовых к применению" жидких лекарственных форм без необходимости дополнительного восстановления и/или без необходимости дополнительного разбавления. В некоторых примерах лекарственные формы могут быть также получены в лиофилизированной или концентрированной форме.

Фармацевтические композиции, содержащие модифицированный полипептид РН20, можно совместно вводить с другим терапевтическим агентом. В таких примерах модифицированные полипептиды РН20 могут быть предусмотрены в виде отдельной лекарственной формы, как фармацевтическая композиция, и могут вводиться перед введением, одновременно с введением, с перерывом или после введения второй композиции, содержащей активный терапевтический агент. В других примерах модифицированные полипептиды РН20 могут быть составлены в виде совместной лекарственной формы с фармацевтическими лекарственными формами других терапевтических агентов.

В частности, в настоящем документе предусмотрены совместные лекарственные формы, содержащие модифицированный полипептид РН20, как описано в настоящем документе, и терапевтический агент, который представляет собой химиотерапевтический агент, болеутоляющий агент, противовоспалительный агент, противомикробный агент, противоамебный агент, противотрихомонадный агент, агент против болезни Паркинсона, противомаларийный агент, противосудорожный агент, антидепрессант и противоревматический агент, противогрибковый агент, антигипертензивный агент, жаропонижающий агент, антипаразитарный агент, антигистаминный агент, α -адренергический агонист, α -блокатор, обезболивающий агент, бронхорасширяющий агент, биоцидный агент, бактерицидный агент, бактериостатический агент, бета-адренергический блокатор, блокатор кальциевых каналов, лекарственный агент для сердечно-сосудистой системы, противозачаточный агент, противозастойный агент, диуретический агент, успокоительный агент, диагностический агент, электролит, гипнотический агент, гормональный агент, гипергликемический агент, мышечный релаксант, мышечный контрактант, офтальмологический агент, парасимпатомиметический агент, стимулянт, седативный агент, симпатомиметический агент, транквилизатор, почечный агент, вагинальный агент, противовирусный агент, витамин, нестероидный противовоспалительный агент, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, лекарство, органическую молекулу или агент, способствующий засыпанию. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 могут быть составлены в виде совместной лекарственной формы с антителом, таким как моноклональное антитело, иммуноглобулином, антибиотиком, бисфосфонатом, цитокином, химиотерапевтическим агентом, фактором коагуляции или инсулином. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть составлены в виде совместной лекарственной формы с модифицированным полипептидом РН20, описаны в разделе Н. В частности, в настоящем документе предусмотрены совместные лекарственные формы, содержащие модифицированный полипептид РН20 и инсулин, такой как быстродействующий инсулин, например, регулярный инсулин или быстродействующие аналоги инсулина. Предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы включают стабильные совместные лекарственные формы, в которых активные агенты, т.е. модифицированный полипептид РН20 и терапевтический агент, обладают повышенной стабильностью и сохраняют активность в течение продолжительных периодов времени, как описано в

настоящем документе.

Лекарственные формы, содержащие РН20, предусмотренные в настоящем документе, в том числе отдельные лекарственные формы и совместные лекарственные формы, стабильны в течение продолжительных периодов времени, в том числе при различных температурах и при различных условиях хранения или применения, таких как перемешивание. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы стабильны и сохраняют активность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20) в условиях "охлаждения", например, при температуре от 2 до 8°C, например при 4°C или примерно при 4°C в течение по меньшей мере 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 месяцев или дольше. В другом примере предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы стабильны и сохраняют активность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20) при комнатной температуре, например при температуре от 18 до 32°C, обычно от 20 до 32°C, например от 28 до 32°C, в течение по меньшей мере от 2 недель до 1 года, например по меньшей мере 3 недель, 4 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 1 года или дольше. В следующем примере предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы стабильны и сохраняют активность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20) при повышенных температурах примерно 30°C или выше 30°C, обычно при температуре от 30 до 42°C или примерно от 30 до 42°C, например от 32 до 37°C, или от 35 до 37°C, или при 37°C, или примерно при 37°C в течение по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60 дней или дольше.

Композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков и лекарственных форм с замедленным высвобождением. Композиция может быть составлена в виде лекарственной формы суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральные лекарственные формы могут включать стандартные носители, такие как фармацевтически чистые маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и другие такие агенты. Также предусмотрены лекарственные формы для местного применения. Лекарственная форма должна соответствовать способу введения.

1. Лекарственные формы (композиции) в виде жидких лекарственных форм, инъеклируемых лекарственных форм и эмульсий.

Лекарственные формы (композиции) обычно получают в соответствии со способом введения. В настоящем документе предусмотрены парентеральное введение обычно путем инъекции или инфузии либо подкожное, внутримышечное, внутривенное или внутрикожное введение. Препараты для парентерального введения включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для смешивания с растворителем непосредственно перед применением, в том числе подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для смешивания со средой для лекарства непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Инъеклируемые композиции могут быть получены в традиционных формах, в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Например, лекарственные формы, содержащие модифицированный полипептид РН20, составленные отдельно или совместно с другим терапевтическим агентом, могут быть предусмотрены в виде фармацевтического препарата в жидкой форме в виде раствора, сиропа или суспензии. В жидкой форме фармацевтические препараты могут быть предусмотрены в виде концентрированного препарата для разбавления до терапевтически эффективной концентрации перед применением. Обычно препараты предусмотрены в дозированной форме, которая не требует разбавления перед применением. В другом примере фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной форме для восстановления водой или другой подходящей средой для лекарства перед применением.

Инъеклируемые композиции разработаны для локального и системного введения. Для целей настоящего документа локальное введение желательно для непосредственного введения в интерстициальную ткань. Растворы могут быть либо водными, либо неводными. При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), а также растворы, содержащие загустители и растворяющие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

Концентрацию фармацевтически активного соединения регулируют таким образом, чтобы инъекция или инфузия обеспечивали эффективное количество для получения желаемого фармакологического эффекта. Точная доза зависит от возраста, веса и состояния пациента или животного, как это известно в данной области техники. Однодозовые парентеральные препараты могут быть упакованы, например, в ампулы, картриджи, флаконы или шприцы с иглой. Объем жидкого раствора или восстановленного из порошка препарата, содержащего фармацевтически активное соединение, зависит от заболевания, подлежащего лечению, и конкретного изделия, выбранного для упаковки. Все препараты для парентераль-

ного введения должны быть стерильными, что известно и практикуется в данной области техники. Процент активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, сильно зависит от его конкретной природы, а также от активности соединения и потребностей субъекта.

Фармацевтические композиции могут включать носители или другие эксципиенты. Например, предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать один или несколько разбавителей, адъювантов, антиадгезионных агентов, связующих агентов, агентов для покрытия оболочкой, наполнителей, вкусоароматических агентов, красителей, смазывающих веществ, глидантов, консервантов, детергентов, сорбентов или подсластителей и любую их комбинацию или среду для лекарства, с которой вводят модифицированный полипептид РН20. Например, фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, используемые в парентеральных препаратах, включают водные среды для лекарства, неводные среды для лекарства, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, связывающие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Лекарственные формы, в том числе жидкие препараты, могут быть получены традиционными способами с применением фармацевтически приемлемых добавок или эксципиентов.

Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", автор E.W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, обычно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для правильного введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода или масла, в том числе минеральные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Вода представляет собой обычный носитель для фармацевтической композиции, которую вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, в инъекируемых растворах. Примеры водных сред для лекарств включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, декстрозу и раствор Рингера с лактатом для инъекций. Неводные парентеральные среды для лекарств включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон, но не ограничиваются ими. Эмульгирующие агенты включают лецитин или аравийскую камедь, но не ограничиваются ими. Детергенты включают полисорбат 80 (TWEEN 80), но не ограничиваются им. Неводные среды для лекарств включают миндальное масло, жирные сложные эфиры или фракционированные растительные масла, но не ограничиваются ими. Противомикробные агенты или консерванты включают метил- или пропил-п-гидроксибензоаты или сорбиновую кислоту, м-крезол, фенол, но не ограничиваются ими. Разбавители включают лактозу, сахарозу, дикальция фосфат или карбоксиметилцеллюлозу, но не ограничиваются ими. Смазывающее вещество включает стеарат магния, стеарат кальция или тальк, но не ограничиваются ими. Связующий агент включает крахмал, природные камеди, такие как аравийская камедь, желатин, глюкозу, мелассу, поливинилпирролидон, целлюлозу и ее производные, повидон, кросповидоны и другие такие связующие агенты, известные специалистам в данной области техники. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу, но не ограничиваются ими. Буферы включают фосфат и цитрат, но не ограничиваются ими. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин гидрохлорид. Связывающий агент или агент, хелатирующий ионы металлов, включает ЭДТА. Другие подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, декстрозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, солевой раствор, воду и этанол, но не ограничиваются ими. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для водорастворимых сред для лекарств и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH. Композиция, при желании, также может содержать минорное количество нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, или pH буферные агенты, например ацетат, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитанмонолаурат, триэтаноламин ацетат натрия, олеат триэтаноламина, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, такие как, например, ацетат натрия, фосфат натрия, монолаурат сорбита, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

В частности, в препараты для парентерального введения, упакованные в многодозовые контейнеры, могут быть добавлены противомикробные агенты (например, консерванты) в бактериостатических или фунгистатических концентрациях (например, эффективное против микроорганизмов количество), которые включают фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, бензалкония хлорид и бензетония хлорид.

Объем лекарственных форм, в том числе предусмотренных в настоящем документе отдельных лекарственных форм или совместных лекарственных форм, содержащих РН20, может представлять собой

любой объем, подходящий для контейнера, в котором предусмотрена лекарственная форма. В некоторых примерах лекарственные формы предусмотрены во флаконе, шприце, шприце-ручке, в резервуаре для помпы или системы с обратной связью или в любом другом подходящем контейнере. Например, объем предусмотренных в настоящем документе лекарственных форм составляет между или примерно между 0,1 и 500 мл, например 0,1 и 100 мл, 1 и 100 мл, 0,1 и 50 мл, например по меньшей мере или примерно по меньшей мере или примерно 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 мл или больше.

а) Лиофилизированные порошки.

Предусмотрены лиофилизированные порошки, которые могут быть восстановлены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Они также могут быть восстановлены и получены в виде твердых веществ или гелей.

Стерильный лиофилизированный порошок получают путем растворения фермента в буферном растворе. Буферный раствор может содержать эксципиент, который повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. В результате последующей стерильной фильтрации раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, получают желаемую лекарственную форму. Жидкая лекарственная форма может быть получена, как описано в настоящем документе выше. Полученную смесь стерильно фильтруют или обрабатывают, чтобы удалить частицы и гарантировать стерильность, и распределяют во флаконы для лиофилизации. Например, лиофилизированный порошок может быть получен путем растворения эксципиента, такого как декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза или другой подходящий агент, в подходящем буфере, таком как цитрат, фосфат натрия или калия, или в другом буфере, известном специалистам в данной области техники. Далее к полученной смеси добавляют выбранный фермент и перемешивают до полного его растворения.

Каждый флакон сделан таким образом, что содержит единственную дозу или множество доз соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например при температуре примерно от 4°C до комнатной температуры. Восстановление этого лиофилизированного порошка соответствующим буферным раствором дает лекарственную форму для применения для парентерального введения.

б) Примеры лекарственных форм (композиций).

Лекарственные формы (композиции) РН20 для однократного введения известны в данной области техники. Например, рекомбинантная гиалуронидаза Hylenex® (гиалуронидаза человека для инъекций) содержит 8,5 мг NaCl (145 мМ), 1,4 мг двухосновного фосфата натрия (9,9 мМ), 1,0 мг альбумина человека, 0,9 мг эдетата динатрия (2,4 мМ), 0,3 мг CaCl₂ (2,7 мМ) на 1 мл композиции и NaOH для доведения значения pH до 7,4. Другие лекарственные формы растворимой гиалуронидазы человека, такие как лекарственные формы gHuPH20, описанные в опубликованной заявке США № US 2011/0053247, включают 130 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,0 или 10 мМ гистидин, 130 мМ NaCl, pH 6,0. Лекарственные формы с любым предусмотренным в настоящем документе модифицированным полипептидом РН20 могут быть получены аналогичным образом.

В дополнение к терапевтически эффективному количеству модифицированного полипептида РН20 и/или другого терапевтического агента примеры предусмотренных в настоящем документе фармацевтических композиций, в том числе отдельных лекарственных форм и совместных лекарственных форм, содержащих РН20, могут содержать NaCl и могут быть получены с необходимым pH для поддержания стабильности активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20 и/или другого включенного в совместную композицию терапевтического агента). Для многодозовых лекарственных форм и других лекарственных форм, которые хранятся в течение длительного времени, композиции обычно также содержат один или несколько консервантов. Также могут быть включены дополнительные стабилизирующие агенты и другие эксципиенты. Примеры компонентов описаны ниже.

и) Соль (например, NaCl).

В примерах в настоящем документе предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции содержат соль, такую как хлорид натрия (NaCl), чтобы поддерживать стабильность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20). Соль, такая как NaCl, обычно требуется для сохранения стабильности и активности РН20. Низкие концентрации соли, обычно меньше 120 мМ, могут оказывать неблагоприятное воздействие на активность РН20 с течением времени и в зависимости от температурных условий. Таким образом, отсутствие соли (например NaCl) или низкая концентрация соли (например NaCl) может привести к нестабильности белка. В некоторых примерах в настоящем документе, тем не менее, модифицированные полипептиды РН20, которые обладают повышенной стабильностью при отсутствии соли или в отсутствие соли, например, при низкой концентрации NaCl или в отсутствие NaCl (см., например, раздел C.1.b.iii), не чувствительны к денатурации. Также присутствие соли (например, NaCl) может оказывать различное воздействие на другие терапевтические агенты. Например, растворимость инсулина и аналогов инсулина имеет тенденцию увеличиваться с уменьшением концентрации соли (например, <140 мМ), и высокие концентрации соли могут приводить к кристаллизации/агрегации инсулина, в особенности при низких температурах (см., например, предварительную заяв-

ку США № 61/520,962; заявки США №№ 13/507263 и 13/507262 и международную PCT заявку № PCT/US 2012/042816). Таким образом, предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции получают в соответствии с требованиями для активного агента (активных агентов). Оценка стабильности активного агента (активных агентов) в лекарственной форме при различных условиях хранения (см., например, раздел G) находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. В конкретных примерах в настоящем документе фармацевтические композиции, в том числе предусмотренные в настоящем документе отдельные лекарственные формы или совместные лекарственные формы, содержащие РН20, содержат NaCl в концентрации между или примерно между 10 и 200 мМ, например между или примерно между 10 и 50 мМ, 50 и 200 мМ, 50 и 120 мМ, 50 и 100 мМ, 50 и 90 мМ, 120 и 160 мМ, 130 и 150 мМ, 80 и 140 мМ, 80 и 120 мМ, 80 и 100 мМ, 80 и 160 мМ, 100 и 140 мМ, 120 и 120 мМ или 140 и 180 мМ.

ii) рН и буфер.

В примерах в настоящем документе предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции имеют рН, позволяющий поддерживать стабильность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20). Например, предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции имеют рН между или примерно между 6,5 и 7,8, например между или примерно между 6,5 и 7,2, 7,0 и 7,8, 7,0 и 7,6 или 7,2 и 7,4. Указание рН в настоящем документе основано на измерении рН при комнатной температуре. Понятно, что рН может изменяться в процессе хранения с течением времени, но, как правило, рН будет сохраняться в диапазоне от или примерно от 6,5 до или примерно до 7,8. Например, рН может варьировать на $\pm 0,1$, $0,2$, $0,3$, $0,4$, $0,5$, $0,6$, $0,7$, $0,8$, $0,9$, $1,0$, $1,2$, $1,3$, $1,4$, $1,5$ или больше. Примеры предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных форм в момент получения имеют рН, равный или равный примерно $7,0 \pm 0,2$, $7,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $7,3 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$, $7,5 \pm 0,2$ или $7,6 \pm 0,2$. При необходимости, рН можно регулировать, используя подкисляющие агенты для понижения рН или подщелачивающие агенты для повышения рН. Примеры подкисляющих агентов включают, но не ограничиваются ими, уксусную кислоту, лимонную кислоту, серную кислоту, соляную кислоту, раствор дигидрофосфата натрия и фосфорную кислоту. Примеры подщелачивающих агентов включают, но не ограничиваются ими, раствор гидрофосфата натрия, карбонат натрия или гидроксид натрия.

Композиции обычно получают, используя буфер, который поддерживает диапазон рН. В предусмотренных в настоящем документе лекарственных формах можно использовать любой буфер, при условии, что он не оказывает отрицательного влияния на стабильность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы РН20) и поддерживает необходимый диапазон рН. Примеры особенно подходящих буферов включают трис, сукцинатный, ацетатный, фосфатный буферы, цитрат, аконитат, малат и карбонат. Специалистам в данной области техники, тем не менее, будет понятно, что предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы не ограничены конкретным буфером при условии, что буфер обеспечивает приемлемый уровень стабильности рН или "буферную емкость" в указанном диапазоне. Обычно буфер имеет достаточную буферную емкость в пределах 1 единицы рН от его рК (Lachman et al. In: *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* 3rd Edn. (Lachman, L., Lieberman, H.A. and Kanig, J.L., Eds.), Lea and Febiger, Philadelphia, p. 458-460, 1986). Пригодность буфера можно оценить на основании опубликованных таблиц рК или можно определить опытным путем с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. рН раствора можно довести до желаемого конечного значения в пределах диапазона, описанного выше, например, используя приемлемую кислоту или основание.

Буферы, которые могут быть включены в предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы, включают, но не ограничиваются ими, Трис (триметамин), гистидиновый буфер, фосфатный буфер, такой как двухосновный фосфат натрия, и цитратный буфер. Такие буферы могут присутствовать в совместных лекарственных формах в концентрациях между или примерно между 1 и 100 мМ, например между или примерно между 10 и 50 мМ или 20 и 40 мМ, например 30 мМ или примерно 30 мМ. Например, такие буферы могут присутствовать в совместных лекарственных формах в концентрации равной или равной примерно 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, 65, 70, 75 мМ или больше.

iii) Консервант (консерванты).

В примерах в настоящем документе многодозовые лекарственные формы или лекарственные формы, которые хранятся в течение длительного времени, содержат эффективное против микроорганизмов количество консерванта или смеси консервантов в таком количестве, которое оказывает бактериостатический или фунгиостатический эффект. В конкретных примерах консерванты присутствуют в достаточной концентрации, чтобы удовлетворять требованиям, например, фармакопеи США (USP) и европейской фармакопеи (EP), в том числе противомикробным требованиям EP (EPA) и предпочтительным противомикробным требованиям EP (EPB) (см. табл. 4). Поскольку присутствие консервантов и, в частности, фенольных консервантов может негативно сказываться на стабильности РН20, такие лекарственные формы, как правило, содержат модифицированный полипептид РН20, который обладает повышенной стабильностью в присутствии консервантов, такой как любой модифицированный полипептид РН20, описанный в разделе С.1.b.i в настоящем документе. Обычно данное количество поддерживает стабиль-

ность активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы PH20). Эффективное против микроорганизмов количество консерванта представляет собой количество, которое обладает противомикробной активностью за счет уничтожения или ингибирования размножения микроорганизмов в образце композиции, что оценивает в тесте на противомикробную эффективность консерванта (АРЕТ). Специалисту в данной области техники известны тест на противомикробную эффективность консерванта и стандарты USP и EPA или EPB, которые должны быть удовлетворены, чтобы соответствовать минимальным требованиям. В общем, тест на противомикробную эффективность консерванта включает испытание композиции с заданным инокулятом подходящих микроорганизмов, т.е. бактерий, дрожжей и грибов, хранение инокулированного препарата при заданной температуре, отбор образцов через точно определенные промежутки времени и подсчет микроорганизмов в образце (см. Sutton and Porter, (2002) PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56(4):300-311; The United States Pharmacopeial Convention, Inc., (effective January 1, 2002), The United States Pharmacopeia 25th Revision, Rockville, MD, Chapter <51> Antimicrobial Effectiveness Testing; and European Pharmacopoeia, Chapter 5.1.3, Efficacy of Antimicrobial Preservation). Используемые в испытании микроорганизмы обычно включают три штамма бактерий, а именно E. coli (ATCC No. 8739), Pseudomonas aeruginosa (ATCC No. 9027) и Staphylococcus aureus (ATCC No. 6538), дрожжи (Candida albicans ATCC No. 10231) и грибы (Aspergillus niger ATCC No. 16404), которые добавляют так, чтобы инокулированная композиция содержала 10^5 или 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов на 1 мл композиции. Консервирующие свойства композиции считаются адекватными, если в условиях теста наблюдается значительное падение количества микроорганизмов или не наблюдается увеличения количества микроорганизмов в инокулированной композиции, как указано в табл. 4, после определенного времени и при заданных температурах. Критерий для оценки приведен в виде уменьшения в единицах десятичного логарифма количества жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с первоначальным образцом или предыдущим моментом времени.

Примеры консервантов, не имеющие ограничительного характера, которые могут быть включены в предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы, включают, но не ограничиваются ими, фенол, метакрезол (м-крезол), метилпарабен, бензиловый спирт, тимеросал, бензалкония хлорид, 4-хлор-1-бутанол, хлоргексидин дигидрохлорид, хлоргексидин диглюконат, L-фенилаланин, ЭДТА, бронопол (2-бром-2-нитропропан-1,3-диол), фенилртутьацетат, глицерин (глицерол), имидомочевину, хлоргексидин, натрия дегидроацетат, ортокрезол (о-крезол), паракрезол (п-крезол), хлоркрезол, цетримид, бензетония хлорид, этилпарабен, пропилпарабен или бутилпарабен и любую их комбинацию. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы могут содержать один консервант. В других примерах лекарственные формы содержат по меньшей мере два различных консерванта или по меньшей мере три различных консерванта. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы могут содержать два консерванта, такие как L-фенилаланин и м-крезол, L-фенилаланин и метилпарабен, L-фенилаланин и фенол, м-крезол и метилпарабен, фенол и метилпарабен, м-крезол и фенол или другие аналогичные комбинации. В одном из примеров, консервант в лекарственной форме содержит по меньшей мере один фенольный консервант. Например, лекарственная форма содержит фенол, м-крезол или фенол и м-крезол.

В предусмотренных в настоящем документе лекарственных формах общее количество одного или нескольких консервантов, выраженное в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем) в лекарственной форме, может составлять, например, от или примерно от 0,1% до или примерно до 0,4%, например между или примерно между 0,1 и 0,3%, 0,15 и 0,325%, 0,15 и 0,25%, 0,1 и 0,2%, 0,2 и 0,3% или 0,3 и 0,4%. Обычно лекарственные формы содержат меньше чем 0,4% (масса/объем) консерванта. Например, предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы содержат по меньшей мере или примерно по меньшей мере 0,1, 0,12, 0,125, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,175, 0,18, 0,19, 0,2, 0,25, 0,3, 0,325, 0,35, но менее 0,4% общего количества консервантов.

В некоторых примерах предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат между или примерно между 0,1 и 0,25% фенола и между или примерно между 0,05 и 0,2% м-крезола, например, между или примерно между 0,10 и 0,2% фенола и между или примерно между 0,06 и 0,18% м-крезола, или между или примерно между 0,1 и 0,15% фенола и между или примерно между 0,08 и 0,15% м-крезола. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат или содержат примерно 0,1% фенола и 0,075% м-крезола; 0,1% фенола и 0,15% м-крезола; 0,125% фенола и 0,075% м-крезола; 0,13% фенола и 0,075% м-крезола; 0,13% фенола и 0,08% м-крезола; 0,15% фенола и 0,175% м-крезола или 0,17% фенола и 0,13% м-крезола.

iv) Стабилизаторы.

В примерах в настоящем документе предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции необязательно могут содержать один или несколько стабилизирующих агентов для поддержания стабильности активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы PH20). Стабилизаторы, которые могут содержаться в предусмотренных в настоящем документе лекарственных формах, включают аминокислоты, производные аминокислот, амины, сахара, полиолы, соли и буферы, сурфактанты и другие агенты. Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат по меньшей мере один стабилизатор. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные

формы содержат по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть или более стабилизаторов. Таким образом, в лекарственные формы согласно настоящему документу может быть включено любое одно или любые несколько соединений, выбранных из аминокислот, производных аминокислот, аминов, сахаров, полиолов, солей и буферов, сурфактантов и других агентов. Обычно лекарственные формы согласно настоящему документу содержат, по меньшей мере, сурфактант и соответствующий буфер. Необязательно, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы могут содержать другие дополнительные стабилизаторы. Другие компоненты включают, например, один или несколько модификаторов тоничности, один или несколько антиоксидантов или другие стабилизаторы.

Примеры стабилизаторов, выбранных из аминокислот, производных аминокислот или аминов включают, но не ограничиваются ими, L-аргинин, глутамин, глицин, лизин, метионин, пролин, Lys-Lys, Gly-Gly, оксид триметиламина (ТМАО) или бетаин. Примеры сахаров и полиолов включают, но не ограничиваются ими, глицерин, сорбит, маннит, инозитол, сахарозу или трегалозу. Примеры солей и буферов включают, но не ограничиваются ими, хлорид магния, сульфат натрия, трис, такой как трис (100 мМ) или бензоат натрия. Примеры сурфактантов включают, но не ограничиваются ими, полоксамер 188 (например, Pluronic® F68), полисорбат 80 (PS80), полисорбат 20 (PS20). Другие стабилизаторы включают, но не ограничиваются ими, гиалуроновую кислоту (HA), сывороточный альбумин человека (HSA), фенолмасляную кислоту, таурохолевую кислоту, поливинилпирролидон (PVP) или цинк.

В конкретных примерах в настоящем документе лекарственные формы содержат один или несколько детергентов, таких как сурфактанты, чтобы поддерживать стабильности активного агента (активных агентов) (например, гиалуронидазы PH20). Например, сурфактант может ингибировать агрегацию PH20 и минимизировать потери вследствие абсорбции. Сурфактанты обычно представляют собой непоиошенные сурфактанты. Сурфактанты, которые могут быть включены в лекарственные формы согласно настоящему документу, включают неполные сложные и простые эфиры многоатомных спиртов и сложные эфиры жирных кислот и многоатомных спиртов и простые эфиры многоатомных спиртов, таких как глицерин или сорбит, полоксамеры и полисорбаты, но не ограничиваются ими. Например, примеры сурфактантов в лекарственных формах согласно настоящему документу включают любой один или несколько сурфактантов, выбранных из полоксамера 188 (PLURONICS®, такие как PLURONIC® F68), TETRONICS®, полисорбата 20, полисорбата 80, PEG 400, PEG 3000, Tween® (например, Tween® 20 или Tween® 80), Triton® X-100, SPAN®, MYRJ®, BRIJ®, CREMOPHOR®, полипропиленгликолей или полиэтиленгликолей. В некоторых примерах лекарственные формы согласно настоящему документу содержат полоксамер 188, полисорбат 20, полисорбат 80, обычно полоксамер 188 (плуроник F68). Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы обычно содержат по меньшей мере один сурфактант, например 1, 2 или 3 сурфактанта.

В предусмотренных в настоящем документе лекарственных формах общее количество одного или нескольких сурфактантов, выраженное в процентной (%) концентрации по массе (масса/объем) в лекарственной форме, может составлять, например, от или примерно от 0,005% до или примерно до 1,0%, например между или примерно между 0,01 и 0,5%, например между или примерно между 0,01 и 0,1% или между или примерно между 0,01 и 0,02%. Обычно лекарственные формы содержат по меньшей мере 0,01% сурфактанта и содержат менее 1,0%, например менее 0,5% или менее 0,1% сурфактанта. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы могут содержать или содержать примерно 0,001, 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,060, 0,065, 0,07, 0,08 или 0,09% сурфактанта. В конкретных примерах предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат или содержат примерно от 0,01% до или примерно до 0,05% сурфактанта.

В предусмотренную в настоящем документе лекарственную форму могут быть включены модификаторы тоничности, чтобы получить раствор с желаемой осмолярностью. Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы имеют осмолярность между или примерно между 245 и 305 мОсм/кг. Например, осмолярность равна или примерно равна 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300 или 305 мОсм/кг. В некоторых примерах лекарственные формы имеют осмолярность, равную или равную примерно 275 мОсм/кг. Модификаторы тоничности включают, но не ограничиваются ими, глицерин, NaCl, аминокислоты, многоатомные спирты, трегалозу и другие соли и/или сахара. Конкретное количество, позволяющее сохранить энзиматическую активность и/или тоничность можно определить опытным путем.

В других примерах в лекарственные формы включен глицерин (глицерол). Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы, как правило, содержат менее 60 мМ глицерина, например менее 55, менее 50, менее 45, менее 40, менее 35, менее 30, менее 25, менее 20, менее 15, 10 мМ или меньше. Количество глицерина, как правило, зависит от количества присутствующего NaCl: чем больше присутствует NaCl в лекарственной форме, тем меньше требуется глицерина для достижения желаемой осмолярности или осмолярности. Таким образом, например, в лекарственные формы, содержащие более высокие концентрации NaCl, нужно включать небольшое количество глицерина или не нужно включать глицерин. В противоположность этому в лекарственные формы, содержащие более низкие концентрации NaCl, может быть включен глицерин. Например, предусмотренные в настоящем доку-

менте лекарственные формы могут содержать глицерин в концентрации от 40 до 60 мМ, например могут содержать глицерин в концентрации менее 50 мМ, например от 20 до 50 мМ, например, в концентрации равной или примерно равной 50 мМ.

Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы также могут содержать антиоксиданты, чтобы уменьшить или предотвратить окисление, в частности окисление полипептида РН20. Например, окисление может быть вызвано высокими концентрациями сурфактанта или олигомеров гиалуронана. Примеры антиоксидантов включают, но не ограничиваются ими, цистеин, триптофан и метионин. В конкретных примерах антиоксидант представляет собой метионин. Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы могут включать антиоксидант в концентрации от или примерно от 5 мМ до или примерно до 50 мМ, например между или примерно между 5 и 40 мМ, 5 и 20 мМ или 10 и 20 мМ. Например, метионин может быть предусмотрен в лекарственных формах в настоящем документе в концентрации от или примерно от 5 мМ до или примерно до 50 мМ, например между или примерно между 5 и 40 мМ, 5 и 20 мМ или 10 и 20 мМ. Например, антиоксидант, например метионин, может быть включен в концентрации, равной или примерно равной 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 или 50 мМ. В некоторых примерах лекарственные формы содержат от 10 до 20 мМ метионина, например 10 или 20 мМ метионина или примерно 10 или 20 мМ метионина. Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы также могут содержать аминокислотный стабилизатор, который вносит вклад в стабильность препарата. Стабилизатор может представлять собой неполярную или основную аминокислоту. Примеры неполярных и основных аминокислот включают, но не ограничиваются ими, аланин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, изолейцин, валин, метионин, глицин и пролин. Например, аминокислотный стабилизатор представляет собой глицин или пролин, как правило, глицин. Стабилизатор может представлять собой одну аминокислоту или он может представлять собой комбинацию 2 или нескольких таких аминокислот. Аминокислотные стабилизаторы могут представлять собой природные аминокислоты, аналоги аминокислот, модифицированные аминокислоты или эквиваленты аминокислот. Обычно аминокислота представляет собой L-аминокислоту. Например, когда пролин используется в качестве стабилизатора, он обычно представляет собой L-пролин. Также можно использовать эквиваленты аминокислот, например аналоги пролина. Концентрация аминокислотного стабилизатора, например глицина, включенного в лекарственную форму, находится в диапазоне от 0,1 до 1 М аминокислоты, как правило, от 0,1 до 0,75 М, обычно от 0,2 до 0,5 М, например, по меньшей мере, концентрация аминокислоты равна или примерно равна 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75 М или больше. Аминокислоту, например, глицин, можно использовать в форме фармацевтически приемлемой соли, такой как гидрохлорид, гидробромид, сульфат, ацетат и т.п. Чистота аминокислоты, например глицина, должна быть по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% или больше.

В некоторых примерах согласно настоящему документу, при необходимости, чтобы стабилизировать РН20, в частности уменьшать эффекты от других дестабилизирующих агентов и условий, присутствующих в лекарственной форме, таких как, например, низкая концентрация соли, высокий рН, присутствие консерванта и повышенные температуры, в лекарственную форму включены ингибиторы гиалуронидазы. Такой компонент обычно не требуется для фармацевтических композиций, содержащих модифицированный полипептид РН20, предусмотренный в настоящем документе, которые обладают повышенной стабильностью в таких условиях. Если в композиции предусмотрены ингибиторы гиалуронидазы, то они содержатся, по меньшей мере, в их равновесных концентрациях. Специалисту в данной области техники известны различные классы ингибиторов гиалуронидаз (см., например, Girish et al. (2009) *Current Medicinal Chemistry*, 16:2261-2288 и цитируемые там ссылки). Специалист в данной области техники знает или может определить стандартными способами равновесную концентрацию ингибитора гиалуронидазы в реакции или в стабильной композиции согласно настоящему документу.

Примером ингибиторов гиалуронидаз для применения в композициях в настоящем документе является гиалуронан (НА). Гиалуроновая кислота (НА, также известная как гиалуронан и гиалуронат) является природным субстратом для РН20. НА представляет собой несulfатированный гликозаминогликан, широко распространенный в соединительной, эпителиальной и нервной тканях. Это полимер, который включает до 25,000 дисахаридных единиц, которые, в свою очередь, состоят из D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина. Молекулярная масса НА находится в диапазоне примерно от 5 до 200,000 кДа. В композициях в качестве стабилизатора можно использовать НА любого размера. В некоторых примерах НА представляет собой дисахарид, состоящий из D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина. В других примерах НА представляет собой олигосахарид, такой как тетрасахарид, содержащий 2 повторяющиеся дисахаридные единицы, или, альтернативно, НА, используемый в предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных формах, может содержать множество повторяющихся дисахаридных единиц, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или больше дисахаридных единиц. В другом примере НА, используемый в предусмотренных в настоящем документе лекарственных формах, имеет молекулярную массу от или примерно от 5 до или примерно до 5000 кДа; от или примерно от 5 до или примерно до 1000 кДа; от или примерно от 5 до или примерно до 500 кДа; или от или примерно от 5 до или примерно до 200 кДа. Примеры олигосахаридов

НА для применения в лекарственных формах в настоящем документе имеют молекулярную массу, равную или равную примерно 6,4, 74,0 или 234,4 кДа. Лекарственные формы могут содержать от 1 до 20 мг/мл НА, от 8 до 12 мг/мл, например по меньшей мере или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/мл или больше НА. В некоторых примерах молярное соотношение НА к РН20 составляет или составляет примерно 100000:1, 95000:1, 90000:1, 85000:1, 80000:1, 75000:1, 70000:1, 65000:1, 60000:1, 55000:1, 50000:1, 45000:1, 40000:1, 35000:1, 30000:1, 25000:1, 20000:1, 15000:1, 10000:1, 5000:1, 1000:1, 900:1, 800:1, 700:1, 600:1, 500:1, 400:1, 300:1, 200:1 или 100:1 или меньше.

В некоторых примерах в качестве стабилизирующего агента используют никотиновое соединение. Никотиновые соединения включают, но не ограничиваются ими, никотинамид, никотиновую кислоту, ниацин, ниацинамид, витамин В3 и/или их соли и/или любые их комбинации. В конкретных применениях стабилизирующий агент может включать никотиновое соединение, аминокислоты или аминокислоту (см., например, международную опубликованную заявку номер WO 2010149772). Например, аминокислота может представлять собой аргинин, глутаминовую кислоту и/или их соли или любые их комбинации.

2. Композиции для других способов введения.

В зависимости от состояния, которое подвергается лечению, в настоящем документе предусмотрены другие способы введения, такие как местное применение, трансдермальные пластыри, пероральное и ректальное введение.

Например, фармацевтические дозированные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки для системного эффекта. Ректальные суппозитории включают твердые тела для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или несколько фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных суппозиториях, представляют собой основы или среды для лекарств и агенты для повышения точки плавления. Примеры основ включают масло какао (какао-масло), глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Могут быть использованы комбинации различных основ. Агенты для повышения точки плавления суппозитория включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории могут быть получены либо прессованием, либо путем формования. Обычная масса ректального суппозитория составляет примерно от 2 до 3 г. Таблетки и капсулы для ректального введения изготавливают с использованием тех же самых фармацевтически приемлемых веществ и тех же самых способов, которые используют для лекарственных форм для перорального введения. Лекарственные формы, подходящие для ректального введения, могут быть предусмотрены в виде однодозовых суппозиториях. Они могут быть получены путем смешивания активного соединения с одним или несколькими традиционными твердыми носителями, например маслом какао, и дальнейшего формования полученной смеси.

Для перорального введения фармацевтические композиции, например, могут быть в форме таблеток или капсул, полученных традиционными способами с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как связующие агенты (например, желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния); разрыхлители (например, картофельный крахмал или натрия крахмала гликолят) или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты с использованием способов, хорошо известных в данной области техники.

Лекарственные формы, подходящие для буккального (сублингвального) введения включают, например, таблетки для рассасывания, содержащие активное соединение в ароматизированной основе, обычно в сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; и пастилки, содержащие соединение в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь.

Смеси для местного применения получают, как описано для локального и системного введения. Полученные смеси могут представлять собой растворы, суспензии, эмульсии или тому подобное, и могут быть составлены в виде лекарственных форм, имеющих вид кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, композиций для орошения, спреев, суппозиториях, повязок, дермальных пластырей или любых других лекарственных форм, подходящих для местного введения.

Соединения или их фармацевтически приемлемые производные могут быть в виде лекарственных форм в форме аэрозолей для местного применения, например для ингаляции (см., например, патенты США №№ 4044126, 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для доставки стероидов, используемых для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы). Эти лекарственные формы для введения в дыхательный путь могут быть в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляции, индивидуального или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы лекарственных форм, как правило, будут иметь диаметр менее 50 мкм или менее 10 мкм.

Соединения могут быть в виде лекарственных форм для локального или местного применения, на-

пример для местного применения на кожу и слизистые оболочки, например в глаза, в форме гелей, кремов и лосьонов и для применения для глаз, или для интрацистернального или интраспинального применения. Местное введение предполагается для трансдермальной доставки и также для введения в глаза или слизистые оболочки, или для ингаляционной терапии. Также могут вводиться назальные растворы активного соединения, индивидуально или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Предусмотрены лекарственные формы, подходящие для трансдермального введения. Они могут быть предусмотрены в любой подходящей форме, такой как отдельные пластыри, приспособленные, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение продолжительного периода времени. Такие пластыри содержат активное соединение в необязательно буферном водном растворе в концентрации, например, от 0,1 до 0,2 М по отношению к активному соединению. Лекарственные формы, подходящие для трансдермального введения, также могут быть доставлены с помощью ионтофореза (см., например, Tyle, P., *Pharmaceutical Research* 3(6):318-326 (1986)) и, как правило, имеют форму необязательно буферного водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции также можно вводить в виде лекарственных форм с контролируемым высвобождением и/или с помощью устройств доставки (см., например, в патентах США №№ 3536809; 3598123; 3630200; 3845770; 3916899; 4008719; 4769027; 5059595; 5073543; 5120548; 5591767; 5639476; 5674533 и 5733566).

3. Дозирование и введение.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды РН20 могут быть в виде фармацевтических композиций для многократного или однократного введения. Полипептид РН20 включен в них количестве, достаточном для оказания на пациента, подвергаемого лечению, терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов. Терапевтически эффективную концентрацию можно определить опытным путем, тестируя полипептиды в известных системах *in vitro* и *in vivo*, например используя анализы, предусмотренные в настоящем документе или известные в данной области техники (см., например, 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; Bouffard 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; см. also, например, 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), и далее экстраполируя их для получения доз, рассчитанных на человека.

Количество модифицированного РН20 для введения для лечения заболевания или состояния можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, чтобы идентифицировать оптимальные диапазоны доз, можно использовать анализы *in vitro* и модели на животных. Точная доза, которую можно определить опытным путем, зависит от конкретного фермента, способа введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и тяжести заболевания.

Таким образом, понятно, что точная доза и продолжительность лечения зависят от заболевания, подлежащего лечению, и могут быть определены опытным путем с использованием известных протоколов тестирования или путем экстраполяции данных тестирования *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что концентрации и значения дозы также могут варьировать в зависимости от тяжести состояния, подлежащего облегчению. Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретный режим дозирования может быть скорректирован с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональной оценкой лица, назначающего введение или наблюдающего за введением композиций, и что диапазон концентраций приведен в настоящем документе только в качестве примера и не предназначен для ограничения объема или применения композиций и содержащих их комбинаций. Композиции можно вводить каждый час, каждый день, каждую неделю, каждый месяц, каждый год или один раз. Обычно режим дозирования выбирают для уменьшения токсичности. Следует отметить, что лечащий врач будет знать, как и когда прекратить, прервать или скорректировать лечение, чтобы снизить дозу в связи с токсичностью, или нарушением функционирования костного мозга, печени или почек или других тканей. В противоположность, лечащий врач также будет знать, как и когда скорректировать лечение, чтобы увеличить дозу, если клинический ответ не является адекватным (предотвращая токсичные побочные эффекты).

Как правило, терапевтически эффективная доза модифицированного фермента РН20 составляет или составляет примерно от 10 до 500000 единиц (Ед), от 100 до 100000 Ед, от 500 е до 50000 Ед, от 1000 до 10000 Ед, от 5000 до 7500 Ед, от 5000 до 50000 Ед или от 1000 до 10000 Ед, обычно от 1000 до 50000 единиц в стабилизирующем растворе или суспензии или в лиофилизированной форме. Например, полипептид РН20 можно вводить в дозе, составляющей по меньшей мере или составляющей примерно по меньшей мере или составляющей 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700,

800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 Ед или больше. Лекарственные формы могут быть предусмотрены в однодозовых формах, включая, но не ограничиваясь ими, ампулы, шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы.

Фермент РН20 можно вводить индивидуально или с другим фармакологически эффективным агентом (агентами) или терапевтическим агентом (агентами), в общем количестве 0,1-100 мл, 1-50 мл, 10-50 мл, 10-30 мл, 1-20 мл или 1-10 мл, как правило, 10-50 мл. Как правило, объемы инъекций или инфузий композиции, содержащей РН20, составляют по меньшей мере или по меньшей мере примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 мл или больше. Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат модифицированный полипептид РН20 в количестве между или примерно между 30 и 3000 Ед/мл, 300 и 2000 Ед/мл, или 600 и 2000 Ед/мл, или 600 и 1000 Ед/мл, например по меньшей мере или примерно по меньшей мере 30, 35, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000 или 3000 Ед/мл. Например, предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы содержат РН20 в количестве, которое составляет по меньшей мере от 100 до 1000 Ед/мл, например по меньшей мере или примерно по меньшей мере или примерно или 600 Ед/мл.

Полипептид РН20 может быть предусмотрен в виде раствора в количестве, которое составляет по меньшей мере или примерно или 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800 или 1000 Ед/мл, или может быть предусмотрен в более концентрированной форме, например в количестве, которое составляет по меньшей мере или примерно или 2000, 3000, 4000, 5000, 8000, 10000 или 20000 Ед/мл для непосредственного применения или для разбавления до эффективной концентрации перед применением. Композиции полипептида РН20 могут быть предусмотрены в виде жидкой или лиофилизированной лекарственной формы.

Когда РН20 представлен в виде совместной лекарственной формы с терапевтическим агентом, дозы могут быть предусмотрены как соотношение количества полипептида РН20 к количеству вводимого терапевтического агента. Например, полипептид РН20 можно вводить в соотношениях от 1 Ед гиалуронидазы/Ед терапевтического агента (1:1) до 50:1 или больше, например полипептид РН20 можно вводить в соотношениях или примерно в соотношениях 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 или больше.

Предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы, в том числе совместные лекарственные формы и/или стабильные лекарственные формы, могут быть получены для однократного введения, для многократного введения или для непрерывного введения. Также в настоящем документе предусмотрены имплантируемые системы с замедленным высвобождением или длительным высвобождением, таким образом, что поддерживается постоянный уровень дозирования (см., например, патент США № 3710795).

Например, лекарственные формы фармацевтических терапевтически активных соединений и их производных предусмотрены для введения человеку и животным в однодозовых формах или в многодозовых формах. Например, соединения могут быть в виде лекарственных форм в форме таблеток, капсул, пилюль, порошков, гранул, стерильных парентеральных растворов или суспензий, пероральных растворов или суспензий или эмульсий типа масло-вода, содержащих подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Каждая однократная доза содержит заранее определенное количество терапевтически активного соединения (соединений), достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем, средой для лекарства или разбавителем. Примеры однодозовых форм включают ампулы и шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Однодозовые формы можно вводить в их долях или кратно им. Многодозовая форма представляет собой множество идентичных однодозовых форм, упакованных в один контейнер для введения в виде отдельных однодозовых форм. Примеры многодозовых форм включают флаконы, бутылки для таблеток или капсул или бутылки пинт или галлонов. Таким образом, многодозовая форма представляет собой множество однократных доз, которые не разделены в упаковке. Обычно, могут быть получены дозированные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне от 0,005 до 100%, полученные из нетоксичных носителей.

Предусмотренные в настоящем документе композиции, как правило, составлены в виде лекарственных форм для подкожного введения, хотя рассматриваются и другие способы введения, такие как любые способы, известные специалистам в данной области техники, в том числе внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, внутрикожное, внутриочаговое введение, внутрибрюшинная инъекция, эпидуральное, вагинальное, ректальное, локальное, ушное, трансдермальное введение или любой другой способ введения. Лекарственные формы, подходящие для таких способов, известны специалисту в данной области техники. Введение может быть локальным, местным или системным в зависимости от места лечения. Локальное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, путем локальной инфузии в процессе операции, местным применением, например, в сочетании с раневой повязкой после операции, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, но не ограничиваясь этим. Композиции также можно вводить с другими биологически активными агентами, либо последовательно, с перерывом, либо в той же самой композиции.

Наиболее подходящий способ в каждом конкретном случае зависит от множества факторов, таких как природа заболевания, толерантность субъекта к конкретному способу введения, тяжесть заболевания

и конкретная используемая композиция. Как правило, предусмотренные в настоящем документе композиции вводят парентерально. В некоторых примерах композиции модифицированного полипептида PH20 вводят таким образом, что она достигает интерстиции кожи или тканей, тем самым, деградируя интерстициальное пространство для последующей доставки терапевтического агента. Таким образом, в некоторых примерах предусмотрено непосредственное введение под кожу, например способы подкожного введения. Таким образом, в одном из примеров, локальное введение может быть достигнуто инъекцией, например, с помощью шприца или другого изделия, содержащего устройство для инъекции, такое как игла. В другом примере локальное введение может быть достигнуто инфузией, которую можно осуществить, используя помпу или другое аналогичное устройство. Также предусмотрены другие способы введения. Например, модифицированные полипептиды PH20, в том числе их конъюгированные формы с увеличенным периодом полувыведения, такие как их пегилированные формы, можно вводить внутривенно. Фармацевтические композиции могут быть составлены в дозированных формах, соответствующих каждому способу введения.

Способы введения можно использовать для снижения воздействия на выбранные модифицированные полипептиды PH20 процессов деградации, таких как протеолитическая деградация и иммунологическое воздействие через антигенный и иммуногенный ответы. Примеры таких способов включают локальное введение в месте лечения. Пегилирование терапевтических агентов увеличивает устойчивость к протеолизу, увеличивает период полувыведения из плазмы и уменьшает антигенность и иммуногенность. Примеры методик пегилирования известны в данной области техники (см., например, Lu and Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu and Felix, *Peptide Res.*, 6: 140-6, 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; см. также Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 и Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). Пегилирование также можно использовать в системах доставки молекул нуклеиновых кислот *in vivo*. Например, пегилирование аденовируса может увеличить стабильность и перенос генов (см., например, Cheng et al. (2003) *Pharm. Res.* 20(9): 1444-51).

Для введения выбранных полипептидов PH20 известны и могут использоваться различные другие системы доставки, включая, но не ограничиваясь ими, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный рецепторами эндоцитоз и системы доставки молекул нуклеиновых кислот, кодирующих выбранные полипептиды PH20, такие как ретровирусные системы доставки.

Таким образом, в некоторых вариантах воплощения при введении растворимых полипептидов PH20 также могут быть использованы липосомы и/или наночастицы. Липосомы образованы фосфолипидами, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические бислойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию маленьких однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащих водный раствор в ядре.

При диспергировании в воде фосфолипиды могут образовывать различные структуры, отличные от липосом, в зависимости от молярного соотношения липид/вода. При низких соотношениях липид/вода образуются липосомы. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Липосомы могут демонстрировать низкую проницаемость для ионных и полярных веществ, но при повышенных температурах происходит фазовый переход, который значительно изменяет их проницаемость. Фазовый переход связан с изменением от плотно упакованной, упорядоченной структуры, известной как состояние геля, к неплотно упакованной, менее упорядоченной структуре, известной как жидкое состояние. Это происходит при характерной температуре фазового перехода и приводит к увеличению проницаемости для ионов, сахаров и лекарств.

Липосомы взаимодействуют с клетками посредством различных механизмов: эндоцитозфагоцитирующими клетками ретикулоэндотелиальной системы, такими как макрофаги и нейтрофилы; адсорбция на поверхности клетки, либо за счет неспецифичных слабых гидрофобных или электростатических сил, либо за счет специфичных взаимодействий с компонентами поверхности клетки; слияние с плазматической мембраной клетки путем внедрения липидного бислоя липосомы в плазматическую мембрану с одновременным высвобождением содержимого липосом в цитоплазму; и перенос липосомальных липидов в клеточные или субклеточные мембраны, или наоборот, где механизм не связан каким-либо образом с содержимым липосом. Варьирование композиции липосом может приводить к изменению действующего механизма, хотя одновременно может действовать больше одного механизма. Нанокapsулы обычно могут стабильно и воспроизводимо захватывать соединения. Чтобы избежать побочных эффектов, связанных с внутриклеточной перегрузкой полимером, такие ультрамелкие частицы (размером около 0,1 мкм) должны быть разработаны с использованием полимеров, которые могут деградировать *in vivo*. Для применения согласно настоящему документу предусмотрены биodeградируемые полиалкил-цианакрилатные наночастицы, которые могут удовлетворять этим требованиям, и такие частицы могут быть легко получены.

4. Примеры совместных лекарственных форм PH20-инсулин.

В настоящем документе предусмотрены стабильные совместные лекарственные формы быстросей-

ствующего инсулина, такого как быстродействующий аналог инсулина, и модифицированного полипептида PH20. Любые предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут быть включены в совместную лекарственную форму с инсулином, такие как любые совместные лекарственные формы, описанные в заявке США №№ 13/507263 или 13/507262, или в международной PCT заявке № PCT/US 2012/042816.

В частности, модифицированный полипептид PH20 представляет собой модифицированный полипептид PH20, обладающий повышенной стабильностью в денатурирующих условиях, такой как любой модифицированный полипептид PH20, приведенный в разделах C.I.b. В частности, полипептид PH20 представляет собой модифицированный полипептид PH20, обладающий повышенной стабильностью к одному или нескольким фенольным консервантам, таким как любой модифицированный полипептид PH20, приведенный в разделе C.I.b.i. Например, полипептид PH20 представляет собой модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену на Р в позиции, соответствующей позиции 204 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, такую как аминокислотную замену F204P со ссылкой на любую из последовательностей SEQ ID NOS: 3, 7 или 32-66. В других примерах полипептид PH20 представляет собой модифицированный полипептид PH20, содержащий аминокислотную замену на R в позиции, соответствующей позиции 58 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, такую как замена V58R со ссылкой на любую из последовательностей SEQ ID NOS: 3, 7 или 32-66.

Быстродействующий инсулин может представлять собой регулярный инсулин или быстродействующий аналог инсулина. Инсулин представляет собой полипептид, который после процессинга состоит из 51 аминокислот и содержит А- и В-цепи.

Обычно инсулин содержит А-цепь примерно из 21 аминокислот и В-цепь примерно из 30 аминокислот. А- и В-цепи связаны друг с другом дисульфидными мостиками. Примеры регулярных инсулинов включают, например, инсулин человека (с А цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 862, и В цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 863) или свиной инсулин (с А-цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную как аминокислотные остатки в позициях 88-108 в SEQ ID NO: 864, и В-цепью, имеющей последовательность аминокислот, приведенную как аминокислотные остатки в позициях 25-54 в SEQ ID NO: 864). Примерами быстродействующих аналогов инсулина являются варианты инсулина, которые содержат одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению с инсулином человека, приведенным в SEQ ID NO: 862 и 863 (А- и В-цепи). Например, примеры аналогов инсулина известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, глулизин, имеющий А-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 862, и В-цепь, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 863 (В-цепь; LysB3, GluB29), HMR-1153, имеющий А-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 862, и В-цепь, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 863 (В-цепь; LysB3, IleB28), инсулин аспарт, имеющий А-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 862, и В-цепь, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 863 (В-цепь; AspB28), и инсулин лизпро, имеющий А-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 862, и В-цепь, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 863 (В-цепь; LysB28, ProB29). В каждом приведенном выше примере номенклатура аналогов основана на описании аминокислотных замен в специфических позициях в А- или В-цепях инсулина, пронумерованных с N-конца цепи, где оставшаяся часть последовательности представляет собой последовательность природного инсулина человека. Примеры таких аналогов приведены в SEQ ID NOS: 862 (А-цепь) и имеют В-цепь, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 865-867.

Совместные лекарственные формы стабильны в виде жидкой лекарственной формы в течение продолжительного периода времени, по меньшей мере, в течение 1 месяца при температуре или примерно при температуре от 2 до 8°C включительно, или в течение по меньшей мере 3 дней при температуре или примерно при температуре от 30 до 42°C включительно. Например, совместные лекарственные формы стабильны и сохраняют активность гиалуронидазы PH20 и инсулина в условиях "охлаждения", например, при температуре от 2 до 8°C, например при 4°C или примерно при 4°C, в течение по меньшей мере 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяца, 22 месяцев, 23 месяцев, 24 месяцев, 25 месяцев, 26 месяцев, 27 месяцев, 28 месяцев, 29 месяцев или 30 месяцев или больше. В другом примере предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы стабильны и сохраняют активность гиалуронидазы PH20 и инсулина при комнатной температуре, например при температуре от 18 до 32°C, обычно от 20 до 32°C, например от 28 до 32°C, в течение по меньшей мере от 2 недель до 1 года, например по меньшей мере 3 недель, 4 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 1 года или больше. В следующем примере предусмотренные в настоящем документе композиции стабильны и сохраняют активность гиалуронидазы PH20 и инсулина при повышенных температурах примерно 30°C или выше 30°C, обычно от 30 до 42°C или примерно от 30 до 42°C, например от 32 до 37°C или от 35 до 37°C или примерно при 37°C или при 37°C в течение по меньшей мере 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней,

15 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 35 дней, 40 дней, 45 дней, 50 дней, 60 дней или больше.

Анализы для оценки стабильности активных агентов хорошо известны специалистам в данной области техники. В разделе G предусмотрены примеры анализов для оценки стабильности гиалуронидазы PH20. Стабильность инсулина можно оценить, используя способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Например, стабильность и растворимость инсулина можно оценить визуальной оценкой (например, в том числе по изменению цвета, прозрачности, присутствию агрегатов или хлопьев и адгезии материала или образованию матового налета на стенках сосуда), с помощью кислотного высветления, оптической микроскопии, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), биоанализов *in vitro* или *in vivo* и эксклюзионной хроматографии (SEC) в денатурирующих и не денатурирующих условиях. Биоанализы для оценки активности инсулина *in vitro* или *in vivo* включают, но не ограничиваются ими, анализ конкурентного связывания с использованием клеток, экспрессирующих рецепторы инсулина (например, мембраны плацентарных клеток человека), и меченого радиоактивной меткой инсулина (см., например, Weiss et al, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:40018-40024; Duttaroy et al., (2005) *Diabetes* 54:251-258); анализ поглощения глюкозы, стимулированного инсулином (Louveau et al., (2004) *J. Endocrin.* 181:271-280, Duttaroy et al., (2005) *Diabetes* 54:251-258); анализы для оценки продукции глюкозы в присутствии инсулина (Wang et al., (2000) *J. Biochem.*, 275:14717-14721, Duttaroy et al., (2005) *Diabetes* 54:251-258); и исследования с использованием моделей диабета на животных и/или моделей на здоровых животных (Atkinson et al., (1999) *Nature Med.* 5:601-604; мыши Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), крысы Zucker diabetic fatty (ZDF) и крысы Gato-Katazaki (GK) (Cefalu (2006) *ILAR Journal* 47:186-198).

Примеры таких лекарственных форм содержат от 100 до 1000 Ед/мл модифицированного полипептида PH20 и, в частности, по меньшей мере или примерно 600 Ед/мл; от 10 до 1000 Ед/мл быстродействующего инсулина и, в частности, или по меньшей мере или примерно 100 Ед/мл; NaCl в концентрации между или примерно между 80-140 мМ; pH в диапазоне между или примерно между 7,0 и 7,8; буфер, который поддерживает pH в диапазоне между или примерно между 7,0 и 7,8; консервант в концентрации по массе от 0,1 до 0,4% (масса/объем). Необязательно, может быть включен стабилизирующий агент. Например, предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы содержат от 1 до 100 мМ буферного агента. Например, предусмотренные в настоящем документе совместные лекарственные формы содержат от 0,005 до 0,5% сурфактанта. Примеры предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных форм также могут включать менее 60 мМ глицерина и от 2 мМ до или примерно до 50 мМ антиоксиданта.

Следующие стабильные лекарственные формы приведены только в качестве примера и обеспечивают основу, в которую могут быть внесены незначительные изменения. Понятно, что концентрации различных эксципиентов и других компонентов могут быть незначительно изменены (например, $\pm 15\%$ от указанных концентраций), или может быть незначительно изменен pH, и при этом будет полностью или частично сохраняться растворимость и стабильность инсулина и стабильность PH20. Также могут быть внесены другие изменения за счет добавления или удаления эксципиентов. Например, может быть изменен тип стабилизирующего сурфактанта.

Например, примеры совместных лекарственных форм в настоящем документе содержат от 100 до 1000 Ед/мл модифицированного полипептида PH20 и, в частности, по меньшей мере или примерно по меньшей мере или примерно 600 Ед/мл модифицированного полипептида PH20; от 10 до 1000 Ед/мл быстродействующего инсулина и, в частности, или по меньшей мере или примерно по меньшей мере или примерно 100 Ед/мл быстродействующего инсулина; от или примерно от 10 мМ до или примерно до 50 мМ трис (например, от или примерно от 20 мМ до или примерно до 40 мМ трис, например или примерно 20, 25, 30, 35 или 40 мМ трис); от или примерно от 80 мМ до или примерно до 160 мМ NaCl (например, или примерно 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 или 160 мМ NaCl); от или примерно от 2 мМ до или примерно до 50 мМ метионина (например или примерно 5, 10, 20, 30, 40 или 50 мМ метионина); от или примерно от 0 мМ до или примерно до 50 мМ глицерина (например, или примерно 5, 10, 20, 30, 40 или 50 мМ глицерина); от или примерно от 0,005% до или примерно до 0,5% полоксамера 188, например от 0,01 до 0,05% (например, или примерно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 или 0,05% полоксамера 188); от или примерно от 0,05% до или примерно до 0,25% фенола (например, или примерно 0,1, 0,12, 0,125, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16 или 0,17% фенола); и от или примерно от 0,05% до или примерно до 0,4% м-крезола (например, или примерно 0,075, 0,08, 0,09, 0,1, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16 или 0,17% м-крезола). Лекарственные формы получают с pH от или примерно от 7,0 до или примерно до 7,6 (например, pH составляет или составляет примерно 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или 7,6). В других примерах включен цинк в концентрации, составляющей или составляющей примерно 0,017 мг/100 Ед инсулина, 0,018 мг/100 Ед, 0,02 мг/100 Ед, 0,022 мг/100 Ед или 0,024 мг/100 Ед инсулина.

В конкретных примерах быстродействующий инсулин представляет собой инсулин аспарт, инсулин лизпро или инсулин глулизин. Примеры предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных форм, содержащих модифицированный полипептид PH20 и инсулин лизпро, содержат от или примерно от 25 мМ до или примерно до 35 мМ трис (например, 30 мМ или примерно 30 мМ трис); от

или примерно от 70 мМ до или примерно до 100 мМ NaCl (например, 80 мМ или 100 мМ или примерно 80 мМ или 100 мМ NaCl); от или примерно от 10 мМ до или примерно до 30 мМ метионина (например, 10 мМ или 20 мМ или примерно 10 мМ или 20 мМ метионина); от или примерно от 40 мМ до или примерно до 60 мМ глицерина (например, 50 мМ или примерно 50 мМ глицерина); от или примерно от 0,005% до или примерно до 0,05% полоксамера 188 (например, 0,01% или примерно 0,01% полоксамера 188); от или примерно от 0,017 мг цинка/100 Ед инсулина до или примерно до 0,024 мг цинка/100 Ед инсулина (например, 0,017 мг цинка/100 Ед инсулина, 0,018 мг/100 Ед, 0,02 мг/100 Ед, 0,022 мг/100 Ед или 0,024 мг цинка/100 Ед инсулина); от или примерно от 0,08% до или примерно до 0,17% фенола (например, 0,1, 0,125 или 0,13% фенола); и от или примерно от 0,07% до или примерно до 0,17% м-крезола (например, 0,075, 0,08, 0,13 или 0,15% м-крезола). Например, совместные лекарственные формы могут содержать или содержать примерно 0,1% фенола и 0,015% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,125% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% или примерно фенола и 0,08% м-крезола; или содержать или содержать примерно 0,17% или примерно фенола и 0,13% м-крезола. Такие лекарственные формы инсулина лизпро и модифицированного полипептида PH20 получают с рН от или примерно от 7,0 до или примерно до 7,5 (как правило, рН составляет или составляет примерно рН 7,2).

Примеры предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных форм, содержащих модифицированный полипептид PH20 и инсулин аспарт, содержат от или примерно от 25 мМ до или примерно до 35 мМ трис (например, 30 мМ или примерно 30 мМ трис); от или примерно от 70 мМ до или примерно до 120 мМ NaCl (например, 80 мМ или 100 мМ или примерно 80 мМ или 100 мМ NaCl); от или примерно от 2 мМ до или примерно до 30 мМ метионина, например от 2 мМ до 10 мМ или от 5 мМ до 30 мМ метионина (например, 5 мМ или примерно 5 мМ, 10 мМ или примерно 10 мМ или 20 мМ или примерно 20 мМ метионина); от или примерно от 0,005% до или примерно до 0,05% полоксамера 188 (например, 0,01% или примерно 0,01% полоксамера 188); от или примерно от 0,08% до или примерно до 0,17% фенола (например, 0,1, 0,125 или 0,13% фенола); и от или примерно от 0,07% до или примерно до 0,17% м-крезола (например, 0,075, 0,08, 0,13 или 0,15% м-крезола). Например, совместные лекарственные формы могут содержать или содержать примерно 0,1% фенола и 0,015% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,125% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% фенола и 0,08% м-крезола; или содержать или содержать примерно 0,17% фенола и 0,13% м-крезола. Такие совместные лекарственные формы инсулина аспарт и модифицированного полипептида PH20 получают с рН от или примерно от 7,0 до или примерно до 7,6 (как правило, рН составляет или составляет примерно рН 7,4 или 7,3).

Другие примеры предусмотренных в настоящем документе лекарственных форм, содержащих модифицированный полипептид PH20 и инсулин аспарт, не содержат фенол. Такие приведенные в качестве примера лекарственные формы содержат от или примерно от 25 мМ до или примерно до 35 мМ трис (например, 30 мМ или примерно 30 мМ трис); от или примерно от 70 мМ до или примерно до 120 мМ NaCl (например, 80 мМ или примерно 80 мМ или 100 мМ NaCl); от или примерно от 2 мМ до или примерно до 30 мМ метионина, например от 2 до 10 мМ или от 5 до 30 мМ метионина (например, 5 мМ или примерно 5 мМ, 10 мМ или примерно 10 мМ или 20 мМ или примерно 20 мМ метионина); от или примерно от 0,005% до или примерно до 0,05% полоксамера 188 (например, 0,01% или примерно 0,01% полоксамера 188); и от или примерно от 0,07% до или примерно до 0,4% м-крезола, например, от или примерно от 0,2 до 0,4% м-крезола (например, 0,3, 0,315, 0,35, 0,4% м-крезола). Такие лекарственные формы инсулина аспарт и модифицированного полипептида PH20 получают с рН от или примерно от 7,0 до или примерно до 7,6 (как правило, рН составляет или составляет примерно рН 7,4 или 7,3).

Примеры предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных форм, которые содержат модифицированный полипептид PH20 и инсулин глулизин, содержат от или примерно от 25 мМ до или примерно до 35 мМ трис (например, 30 мМ трис или примерно 30 мМ трис); от или примерно от 100 мМ до или примерно до 150 мМ NaCl (например, 100 или 140 мМ или примерно 100 или 140 мМ NaCl); от или примерно от 10 мМ до или примерно до 30 мМ метионина (например, 10 мМ или примерно 10 или 20 или примерно 20 мМ метионина); от или примерно от 40 мМ до или примерно до 60 мМ глицерина (например, 50 мМ или примерно 50 мМ глицерина); от или примерно от 0,005% до или примерно до 0,05% полоксамера 188 (например, 0,01% или примерно 0,01% полоксамера 188); от или примерно от 0,08% до или примерно до 0,17% фенола (например, 0,1, 0,125 или 0,13% фенола); и от или примерно от 0,07% до или примерно до 0,17% м-крезола (например, 0,075, 0,08, 0,13 или 0,15% м-крезола). Например, совместные лекарственные формы могут содержать или содержать примерно 0,1% фенола и 0,015% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,125% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% фенола и 0,075% м-крезола; содержать или содержать примерно 0,13% фенола и 0,08% м-крезола; или содержать или содержать примерно 0,17% фенола и 0,13% м-крезола. Такие лекарственные формы инсулина глулизина и модифицированного полипептида PH20 получают с рН от или примерно от 7,0 до или примерно до 7,6 (как правило, рН составляет или составляет примерно рН 7,4).

5. Упаковка, изделия и наборы.

Фармацевтические соединения модифицированных полипептидов PH20, или нуклеиновые кислоты,

кодирующие такие полипептиды, или их производные, или их варианты могут быть упакованы в виде изделий, содержащих упаковочный материал, фармацевтическую композицию, эффективную для лечения заболевания или состояния, и этикетку, которая указывает на то, что фармацевтическая композиция или терапевтическая молекула предназначена для лечения заболевания или расстройства. Комбинации выбранного модифицированного полипептида РН20, или его производного, или варианта и терапевтического агента также могут быть упакованы в виде изделия.

Предусмотренные в настоящем документе изделия содержат упаковочный материал. Упаковочный материал для применения для упаковки фармацевтических продуктов хорошо известен специалистам в данной области техники. См., например, патент США № 5323907, 5052558 и 5033252, каждый из которых включен в настоящий документ во всей своей полноте. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают, но не ограничиваются ими, блистерные упаковки, бутылки, пробирки, ингаляторы, помпы, мягкие контейнеры, флаконы, контейнеры, шприцы, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранной лекарственной формы и предполагаемого способа введения и лечения. Изделия могут включать иглу или другое устройство для инъекции, чтобы облегчить введение (например, субэпидермальное введение) в виде местных инъекций. Для соединений и композиций, предусмотренных в настоящем документе, включая модифицированный полипептид РН20 и терапевтический агент, такой как быстродействующий инсулин, для которого известно применение для лечения конкретного заболевания или расстройства, предусмотрен широкий спектр лекарственных форм. Выбор упаковки зависит от РН20 и/или терапевтического агента, и от того, будут ли такие композиции упакованы вместе или отдельно. В одном из примеров РН20 может быть упакован в виде смеси с терапевтическим агентом. В другом примере компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций.

Модифицированные полипептиды РН20, терапевтические агенты и/или изделия с ними также могут быть предусмотрены в виде наборов. Наборы могут включать описанные в настоящем документе фармацевтические композиции и устройство для введения, предусмотренное в виде изделия. Например, полипептид РН20 может поставляться с устройством для введения, таким как шприц, ингалятор, стаканчик для дозирования, пипетка или аппликатор. Композиции могут содержаться в устройстве для введения или они могут быть предусмотрены отдельно, чтобы добавить их туда позже. Набор необязательно может включать инструкции по применению, включая дозы, режим дозирования и инструкции по способам введения. Наборы также могут включать описанные в настоящем документе фармацевтические композиции и устройство для диагностики. Например, такие наборы могут включать устройство для измерения концентрации, количества или активности выбранной протеазы у субъекта.

Г. Способы оценки активности и стабильности РН20

Для оценки стабильности и активности предусмотренных в настоящем документе полипептидов РН20 можно использовать различные анализы. Анализы можно использовать для оценки гиалуронидазной активности полипептида РН20 в конкретных условиях, например температурных условиях, и/или с течением времени. Такие анализы можно использовать, например, для определения стабильности полипептида РН20 в специфических денатурирующих условиях, включая, но не ограничиваясь этим, при повышенных температурах выше чем 30°C или примерно при 30°C, или при 30°C (например, от 30 до 42°C, например 37°C или примерно 37°C), при перемешивании, в присутствии эксципиентов (например, консервантов) или при низком содержании или в отсутствие NaCl (соли). Например, стабильность при специфических условиях можно контролировать, оценивая активность, растворимость и стабильность (например, образование агрегатов и т.п.) в отсутствие воздействия денатурирующего условия и после воздействия денатурирующего условия в различные моменты времени при наличии этого условия. Таким образом, можно оценить стабильность с течением времени. Стабильность также можно оценить, сравнивая любой один или несколько параметров, выбранных из активности, растворимости или агрегации, в присутствии одного или нескольких денатурирующих условий по сравнению с нативным полипептидом РН20, полипептидом РН20 дикого типа или полипептидом РН20 сравнения. Анализы также можно использовать, чтобы внести незначительные изменения в предусмотренные в настоящем документе лекарственные формы при сохранении стабильности обоих активных агентов.

1. Гиалуронидазная активность.

Активность модифицированного полипептида РН20 можно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, в анализе USP XXII для гиалуронидазы активность определяется косвенно путем измерения количества субстрата недеградированной гиалуроновой кислоты, или гиалуронана (НА), оставшегося после взаимодействия фермента с НА в течение 30 мин при 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD). Для анализа для определения активности любой гиалуронидазы в единицах можно использовать стандарт сравнения гиалуронидазы (USP) или стандартный раствор гиалуронидазы Национального формуляра (NF). В одном из примеров активность измеряют, используя микротурбидиметрический анализ. Он основан на образовании нерастворимого осадка, когда гиалуроновая кислота связывается с реагентом, который ее осаждает, таким как подкисленная сыворотка или цетилпиридиний хлорид (CPC). Активность измеряют путем инкубации гиалуронидазы с гиалуронатом натрия (гиалуроновой кислотой) в течение некоторого периода времени (например, 10 мин) и последующей преципитации недеградированного гиа-

луроната натрия подкисленной сывороткой или СРС. Мутность полученного образца измеряют при 640 нм после дополнительного периода инкубации. Снижение мутности вследствие действия гиалуронидазной активности на субстрат гиалуронат натрия представляет собой показатель энзиматической активности гиалуронидазы.

В другом примере гиалуронидазную активность измеряют с использованием микротитровального анализа, в котором измеряют оставшуюся после инкубации с гиалуронидазой биотинилированную гиалуроновую кислоту (см., например, Frost and Stern (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269, опубликованную заявку США № 20050260186). Свободные карбоксильные группы в остатках гиалуроновой кислоты биотинилированы, и биотинилированный субстрат гиалуроновая кислота ковалентно связан с микротитрационным планшетом. После инкубации с гиалуронидазой оставшийся биотинилированный субстрат гиалуроновую кислоту обнаруживают с помощью авидин-пероксидазной реакции, и сравнивают с результатами, полученными после реакции со стандартами гиалуронидазы известной активности.

Другие анализы для измерения активности гиалуронидазы также известны в данной области техники и могут использоваться в способах согласно настоящему документу (см., например, Delpech et al., (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41; Takahashi et al., (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

Многие анализы для гиалуронидазы были основаны на измерении образования новых восстанавливающих N-ацетиламино групп (Bonner and Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13:746-752, 1966), или снижении вязкости (De Salegui et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 121:548-554, 1967) или мутности (Dorfman and Ott, *J. Biol. Chem.* 172:367, 1948). При использовании очищенных субстратов все эти способы являются достаточными для определения присутствия или отсутствия эндогликозидазной активности.

По существу, очищенные гликозаминогликановые субстраты также можно использовать в анализе сдвига в геле. Для тестирования эндогликозидазной активности гликозаминогликаны смешивают с рекомбинантным РН20, таким как растворимый РН20, и это приводит к сдвигу в подвижности субстрата в геле. Примеры таких субстратов включают, но не ограничиваются ими, хондроитин-4 и хондроитин-6 сульфат, дерматансульфат, гепарансульфат, которые можно получить от Sigma Chemical. Гиалуронан из пупочного канатика человека можно получить от ICN. Например, каждый тестируемый субстрат можно разбавить до или примерно до 0,1 мг/мл в буфере с диапазоном рН 3,5-7,5. В таких примерах анализа 10 мкл или примерно 10 мкл образца очищенного растворимого РН20 или кондиционированной среды от клеток, экспрессирующих РН20, можно смешать с 90 мкл или примерно 90 мкл тестируемого субстрата в необходимом буфере и инкубировать в течение 3 ч при 37°C. После инкубации образцы нейтрализуют буфером для образцов (трис, ЭДТА, рН 8,0, бромфеноловый синий и глицерин) и затем проводят электрофорез. Гликозаминогликаны можно обнаружить любым способом, известным в данной области техники, например гликозаминогликаны можно обнаружить окрашиванием гелей, используя 0,5% альциановый синий в 3% ледяной уксусной кислоте в течение ночи с последующим обесцвечиванием в 7% ледяной уксусной кислоте. Деградацию определяют, сравнивая подвижность субстрата в присутствии и отсутствии фермента.

Гиалуронидазную активность также можно определить с помощью зимографии с субстратом в геле (Guentenhoner et al. (1992) *Matrix* 12:388-396). В этом анализе образец вносят в SDS-PAGE гель, содержащий гиалуроновую кислоту, и белки в образце разделяют электрофорезом. Гель далее инкубируют в буфере для ферментного анализа и после этого окрашивают для обнаружения гиалуроновой кислоты в геле. Гиалуронидазная активность визуализируется в виде осветленной области в геле с субстратом.

Также можно оценить способность полипептида РН20, в том числе предусмотренного в настоящем документе модифицированного полипептида РН20, действовать как усиливающий распространение или диффузию агент. Например, краситель трипановый синий можно подкожно инъецировать с полипептидом РН20 или без полипептида РН20 в кожу на боку с каждой стороны безтимусной мыши. Далее для определения способности полипептида РН20 действовать как усиливающий распределение агент, измеряют область распространения красителя, например, с помощью микроштангенциркуля (опубликованная заявка США № 20060104968).

Функциональную активность полипептида РН20 можно сравнить и/или нормализовать по отношению к стандарту сравнения с использованием любого из этих анализов. Это может быть сделано, чтобы определить функционально эквивалентное количество полипептида РН20. Например, способность полипептида РН20 действовать как усиливающий распространение или диффузию агент можно определить путем его инъекции в кожу на боку мыши с трипановым синим и можно определить количество, необходимое для достижения той же диффузии, которая достигается, например, для 100 единиц стандарта сравнения гиалуронидазы. Необходимое количество полипептида РН20, таким образом, является функционально эквивалентным 100 единицам гиалуронидазы.

2. Растворимость.

Растворимость полипептида РН20 можно определить любым известным специалисту в данной области способом. Одним из способов определения растворимости является распределение в детергентах. Например, растворимый полипептид РН20 можно отличить, например, по его распределению в водную фазу раствора Triton® X-114 при 37°C (Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-1607). Заякоренные в мембране полипептиды, такие как заякоренные липидами гиалуронидазы, в том числе GPI-заякоренные

гиалуронидазы, будут распределяться в фазу, богатую детергентом, но будут распределяться в фазу, бедную детергентом, или в водную фазу после обработки фосфолипазой С. Фосфолипаза С представляет собой фермент, который расщепляет фосфоглицериновую связь в GPI-заякоренных белках. Обработка PLC вызовет высвобождение GPI-связанных белков из внешней мембраны клетки.

3. Чистота, кристаллизация или агрегация.

Стабильность предусмотренного в настоящем документе полипептида РН20 также можно оценить с использованием других способов и анализов, известных в данной области техники. В дополнение к оценке стабильности на основе гиалуронидазной активности можно оценивать стабильность по визуальному осмотру, проценту обнаружения, чистоте белка и относительной температуре плавления.

Например, чистоту белка можно измерить с помощью обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Чистота белка при определении с помощью ОФ-ВЭЖХ представляет собой процент основного пика белка РН20 по сравнению со всеми другими присутствующими белковыми веществами. Таким образом, с помощью ОФ-ВЭЖХ и аналогичных способов, известных специалистам в данной области техники, можно оценить деградацию фермента. Можно оценить чистоту белка с течением времени. Чистоту белка также можно оценить при наличии одного или нескольких денатурирующих условий и при различных их величинах. Процент обнаружения также можно определить как относительный процент полипептида в различных условиях (денатурирующие условия, время хранения, способ хранения, например, в сосуде или в контейнере или другие аналогичные параметры, которые могут быть изменены) по сравнению с образцом сравнения. Стабильность полипептида РН20 также можно определить путем измерения окисления гиалуронидазы с помощью ОФ-ВЭЖХ. Процент окисления является мерой суммы площадей пиков основного (ох-1) и минорного (ох-2) пиков.

В одном из примеров температуру плавления полипептида РН20, такого как модифицированный полипептид РН20, можно определить путем измерения гидродинамического радиуса частиц с помощью динамического рассеяния света при различных условиях (например, денатурирующие условия или другие условия хранения). Увеличение размера частиц и уменьшение температуры плавления свидетельствует о денатурации и последующей агрегации гиалуронидазы.

Другие способы, известные специалистам в данной области техники, которые можно использовать для определения стабильности гиалуронидазы в предусмотренных в настоящем документе совместных лекарственных формах, включают электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE), иммуноблоттинг, спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрию, спектроскопию кругового дихроизма (CD) и флуоресцентный анализ с помощью красителей.

4. Фармакодинамика/Фармакокинетика.

Эффект от введения полипептида РН20, такого как модифицированный полипептид РН20, индивидуального или в комбинации с другим терапевтическим агентом на фармакокинетические и фармакодинамические свойства любого вводимого агента также можно оценить *in vivo* с использованием моделей на животных и/или людей в качестве субъектов, например, в условиях клинического исследования. Фармакокинетические или фармакодинамические исследования можно проводить с использованием моделей на животных или можно проводить в ходе исследований с пациентами, которым вводят полипептид РН20 или модифицированный РН20.

Модели на животных включают, но не ограничиваются ими, модели на мышах, крысах, кроликах, собаках, морских свинках и низших приматах, таких как яванские макаки или макаки-резус. В некоторых примерах фармакокинетические и фармакодинамические исследования проводят с использованием здоровых животных. В других примерах исследования проводят с использованием моделей заболевания на животных, где для заболевания предусмотрена терапия гиалуронатом, таких как модели на животных любого ассоциированного с гиалуронатом заболевания или расстройства, например модель опухоли.

Фармакокинетические свойства полипептида РН20, такого как модифицированный полипептид РН20, можно оценить с помощью измерения таких параметров, как максимальная (пиковая) концентрации (C_{max}), время достижения пиковой концентрации (т.е. когда концентрация максимальная; T_{max}), минимальная концентрации (т.е. минимальная концентрация между дозами; C_{min}), период полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е. площадь под кривой, полученной в результате построения зависимости концентрации от времени; AUC), после введения. Абсолютную биодоступность гиалуронидазы можно определить путем сравнения площади под кривой для гиалуронидазы после подкожной доставки (AUC_{sc}) с AUC для гиалуронидазы после внутривенной доставки (AUC_{iv}). Абсолютную биодоступность (F) можно посчитать с использованием формулы $F = ([AUC]_{sc} \times \text{доза}_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times \text{доза}_{iv})$. Для оценки эффекта от увеличения или уменьшения концентраций фермента, такого как модифицированный полипептид РН20, в дозе в фармакокинетических исследованиях можно водить различные дозы и использовать различную частоту дозирования.

Н. Способы лечения и комбинированная терапия

В настоящем документе предусмотрены способы и применения любых предусмотренных в настоящем документе модифицированных полипептидов РН20, которые обладают гиалуронидазной активностью, основанную на их способности деградировать гликозаминогликан (гликозаминогликаны), такие как гиалуронат. Благодаря такой активности модифицированные полипептиды РН20 можно использо-

вать в качестве усиливающего распространение фактора для увеличения доставки и/или биодоступности подкожно вводимых терапевтических агентов. Доставке любого терапевтического агента, включая, но не ограничиваясь ими, пептиды, белки, низкомолекулярные лекарства, нуклеиновые кислоты и вирусы, может способствовать совместное введение с предусмотренным в настоящем документе полипептидом PH20, или такую доставку можно усилить совместным введением с предусмотренным в настоящем документе полипептидом PH20. Например, модифицированные полипептиды PH20 можно использовать для увеличения доставки терапевтических агентов, таких как антитела (например, моноклональные антитела), цитокины, иммуноглобулины, инсулин или факторы коагуляции в желаемые места, например, увеличивая проникновение химиотерапевтических агентов в солидные опухоли. Модифицированные полипептиды PH20 также можно использовать для лечения ассоциированного с гиалуронатом заболевания или расстройства, характеризующегося избытком или накоплением гиалуронана. Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 можно использовать для лечения опухоли; для лечения накопления гликозаминогликана в мозге; для лечения сердечно-сосудистого расстройства; для лечения офтальмологического расстройства; для лечения легочного заболевания; для лечения целлюлита; и/или для лечения пролиферативного расстройства.

Другие способы и применения модифицированного полипептида PH20 включают любые известные специалистам в данной области техники. Например, различные формы гиалуронидаз PH20 были получены и одобрены для терапевтического применения для людей. Например, препараты гиалуронидаз, полученных из животных, включают Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), очищенную овечью тестикулярную гиалуронидазу, и Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), бычью тестикулярную гиалуронидазу. Hylpenex® (Halozyme Therapeutics) представляет собой человеческую рекомбинантную гиалуронидазу, полученную путем генной инженерии в клетках яичника китайского хомячка (CHO), содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый gHuPH20 (см. например, патент США № 7767429). Утвержденные терапевтические применения для гиалуронидаз включают применение в качестве адъюванта для увеличения абсорбции и распространения других терапевтических агентов для подкожного вливания (подкожное введение жидкости) и в качестве адъюванта в подкожной урографии для улучшения резорбции рентгеноконтрастных агентов. В дополнение к этим показаниям гиалуронидазы можно использовать в качестве терапевтических или косметических агентов для лечения других заболеваний и состояний. Например, гиалуронидазы обычно используют, например, для окологубульбарной блокады при местной анестезии перед офтальмологической операцией. Наличие фермента не требует дополнительного блокирования и сокращает время наступления акинезии (потери движения глаза). Окологубульбарная и субтеноновая блокада являются наиболее обычными применениями гиалуронидазы для офтальмологических процедур. Гиалуронидаза также может способствовать акинезии в косметической хирургии, такой как блефаропластика и подтяжки. Понятно, что предусмотренные в настоящем документе растворимые гиалуронидазы PH20, в том числе гиалуронидазы esPH20, можно использовать в любом способе лечения или в комбинированной терапии, для которых применяется гиалуронидаза PH20 (см., например, опубликованные заявки США №№ US 20040268425; US 20050260186; US 20060104968 и заявку США № 12/381844, опубликованную как заявка США № US 20100074885; 12/386249, опубликованную как заявка США № US 20090311237; 12/387225, опубликованную как заявка США № US 20090304665; и 12/386222, опубликованную как заявка США № US 2010003238, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Примеры способов и применений, не носящие ограничительного характера, описаны в следующих подразделах.

1. Способы доставки терапевтических агентов.

Как отмечалось выше, гиалуронидазы представляют собой усиливающие распределение или диффузию вещества, которые модифицируют проницаемость соединительной ткани посредством гидролиза гиалуроновой кислоты, полисахарида, присутствующего в межклеточном основном веществе соединительной ткани, и некоторых специализированных тканей, таких как пупочный канатик и стекловидное тело. В отсутствие усиливающего распространение фактора вещества, инъецируемые подкожно, такие как лекарства, белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, распространяются очень медленно. Совместная инъекция с гиалуронидазой, тем не менее, может привести к быстрому распространению. Скорость диффузии пропорциональна количеству фермента, и величина диффузии пропорциональна объему раствора.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 можно использовать для обеспечения лучшей доставки или для усиления доставки агентов и молекул к любым различным тканям млекопитающих *in vivo*. Их можно использовать для усиления диффузии и, следовательно, для обеспечения лучшей доставки низкомолекулярных фармакологических агентов, а также более крупных фармакологических агентов, таких как белки, нуклеиновые кислоты и рибонуклеиновые кислоты, и макромолекулярных композиций, которые могут содержать комбинацию компонентов, таких как нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, липиды, молекулы на основе липидов и лекарства, но не ограничиваясь ими (см., например, опубликованные заявки США №№ US 20040268425; US 20050260186 и US 20060104968). Модифицированные полипептиды PH20 можно совместно вводить и/или составлять в ви-

де совместных лекарственных форм с терапевтическим агентом для улучшения биодоступности, а также фармакокинетических (PK) и/или фармакодинамических (PD) характеристик совместно вводимых агентов или составленных в виде совместных лекарственных форм агентов. Параметры PK/PD, которые могут быть улучшены благодаря использованию растворимого PH20, такого как ePH20, включают такие параметры как C_{max} (максимальная концентрация агента, достигаемая после абсорбции, например, в кровотоке), T_{max} (время, необходимое для достижения максимальной концентрации), $T_{1/2}$ (время, необходимое, чтобы концентрация упала вдвое), C_{min} (минимальная концентрация агента после метаболизма и экскреции), AUC (площадь под кривой зависимости концентрации от времени, показатель общей величины биодоступности), концентрации в различных исследуемых тканях (в том числе, например, скорость достижения желаемой концентрации, общий уровень и продолжительность поддержания желаемых уровней) и E_{max} (максимальный достигаемый эффект).

Предусмотренные в настоящем документе способы лечения включают комбинированную терапию с терапевтическим агентом для лечения заболевания или расстройства, на которое воздействует терапевтический агент. Любой терапевтический агент, который облегчает или иным способом уменьшает тяжесть заболевания или состояния, может быть комбинирован с предусмотренным в настоящем документе модифицированным полипептидом PH20, чтобы увеличить биодоступность такого терапевтического агента. В частности, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 можно использовать в каждой и в любой из комбинаций, описанных в заявках, см., например, опубликованные заявки США №№ US 20040268425; US 20050260186; US 20060104968 и заявку США № 12/381844, опубликованную как заявка США № US 20100074885; 12/386249, опубликованную как заявка США № US 20090311237; 12/387225, опубликованную как заявка США № US 20090304665; и 12/386222, опубликованную как заявка США № US 2010003238, вместо раскрытой гиалуронидазы или деградирующего гиалуронан фермента.

Модифицированные полипептиды PH20 можно вводить перед, после, с перерывом или одновременно с препаратом терапевтического агента. Обычно модифицированный полипептид PH20 вводят перед или одновременно с введением препарата терапевтического агента, чтобы PH20 мог деградировать гиалуроновую кислоту в интерстициальном пространстве. PH20 можно вводить в место, отличающееся от места введения терапевтической молекулы, или растворимый PH20 можно вводить в то же самое место, что и терапевтическую молекулу.

Примеры фармацевтических, терапевтических и косметических агентов и молекул, которые можно вводить с гиалуронидазой, включают, но не ограничиваются этим, химиотерапевтический или противораковый агент, болеутоляющий агент, антибиотик, противовоспалительный агент, противомикробный агент, противоамебный агент, противотрихомонадный агент, агент против болезни Паркинсона, противомаларийный агент, противосудорожный агент, антидепрессант и противоревматический агент, противогрибковый агент, антигипертензивный агент, жаропонижающий агент, антипаразитарный агент, антигистаминный агент, α -адренергический агонист, α -блокатор, обезболивающий агент, бронхорасширяющий агент, биоцидный агент, бактерицидный агент, бактериостатический агент, β -адренергический блокатор, блокатор кальциевых каналов, лекарственный агент для сердечно-сосудистой системы, противозачаточный агент, косметический или эстетический агент, противозастойный агент, диуретический агент, успокоительный агент, диагностический агент, электролит, гипнотический агент, гормональный агент, гипергликемический агент, мышечный релаксант, мышечный контрактант, офтальмологический агент, парасимпатомиметический агент, стимулянт, седативный агент, агент, способствующий засыпанию, симпатомиметический агент, транквилизатор, почечный агент, вагинальный агент, противовирусный агент, витамин, нестероидный противовоспалительный агент, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента и любые их комбинации. В частности, терапевтические агенты включают антитела, в том числе моноклональные антитела, бисфосфонаты, инсулины, факторы коагуляции, цитокины и иммуноглобулины.

Например, предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 можно использовать для улучшения доставки химиотерапевтических агентов. Гиалуронидазы также использовали для увеличения активности химиотерапевтических агентов и/или доступности опухоли для химиотерапевтических агентов (Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, abstract no. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45:H.9; Baumgartner et al. (1988) Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al. (1986) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390). Комбинированная химиотерапия с гиалуронидазами эффективна для лечения различных раков, в том числе рака мочевого пузыря (Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307), плоскоклеточной карциномы (Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297), рака молочной железы (Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596) и рака желудочно-кишечного тракта (Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8:391-396). В этом примере модифицированная гиалуронидаза PH20 усиливает проникновение химиотерапевтического или другого противоракового агента в солидные опухоли, тем самым подвергая заболевание лечению.

Композиции, содержащие растворимый PH20, могут быть введены внутрь опухоли с противораковыми агентами или внутривенно в случаях диссеминированного рака или труднодоступных опухолей.

Противораковый агент может представлять собой химиотерапевтический агент, антитело, пептид или генотерапевтический вектор, вирус или ДНК. Кроме того, гиалуронидазу можно использовать для вовлечения опухолевых клеток в циркулирующий пул для увеличения чувствительности прежде невосприимчивых к химиотерапии опухолей, которые приобрели множественную лекарственную устойчивость (St Croix et al., (1998) *Cancer Lett* September 131(1): 35-44).

Примеры противораковых агентов, которые можно вводить после введения, одновременно с введением или до введения растворимого РН20, такого как esРН20, включают, но не ограничиваются ими, ацивирин; акларубин; акидизол; акронин; адозелезин; алдеслейкин; алитретиноин (9-цис-ретиноевая кислота); аллопуринол; альтретамин; альвоцидид; амбазон; амбомицин; аметантрон; амифостин; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; анаксирон; анцитабин; антрамицин; апазиквон; аргимесна (Argimesna); триоксид мышьяка; аспарагиназа; асперлин; атримустин; азацитидин; азетепа (Azetepa); азотомидин; баноксантрон; батабулин; батимастат; живая вакцина БЦЖ; бенаксидин; бендамустин; бензодеп (Benzodop); бексаротен; бевализумаб; бикалутаид; бизтасерпин; бирикодар; бисантрон; бисантрон; биснафида димезилат; бизелезин; блеомидин; бортезомиб; бреквинар; бропиримином; будотитан; бусульфид; кактиномицин; калустерон; канертиниб; капецитабин; карацемид; карбетимид; карбоплатин; карбоквон; кармофур; кармустин с полифепрозаном; кармустин; карубицин; карзелезин; цедефингол; целекоксиб; цемадотин (Cemadotin); хлорамбуцил; циотеронел (Cioteronel); циплактин (Ciplactin); циролемицин; цисплатин; кладрибин; кланфенур; клофарабин; кринатол; циклофосфамид; цитарабин липосомальный; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; дарбэпоэтин альфа; даунорубин липосомальный; даунорубин/дауномицин; даунорубин; децитабин; денилейкин дифтитокс; декснугулдипин; дексона; дексразоксан; дезагуанин; диазиквон; диброспидий; диенгест; диналин; дисермолид; доцетаксел; дофеквидар (Dofequidar); доксифлуридин; доксорубин липосомальный; доксорубин HCl; доксорубин HCl липосомальный для инъекций; доксорубин; дролоксифен; дромастанолон пропионат; дуазомицин (Dua-zomycin); экомустин; эдатрексат; эдотекарин; эфлорнитин; элакридар; элинафид; раствор Elliott's B; элсамитруцин; эмитефур (Emitefur); энлоплатин; энпромаг; энзастаурин; эпипропидин; эпирубицин; эпоэтин альфа; эпталопрогест; эрбулозол; эзорибуцин; эстрамустин; этанидазол; этоглуцид; этопозида фосфат; этопозид VP-16s; этопозид; этоприн; экземестан; эксисулинд; фадрозол; фазарабин; фенретирид; филгра-стим; флоксурин; флударабин; фторурацил; 5-фторурацил; флюооксиместерон; фторцитабин; фоскви-дон (Fosquidone); фостриецин; фостриецин; фотретаин; фулвестрант; галарубицин; галоцитабин; гемци-табин; гемтузумаб/озогамицин; герохинол; гиматекан; гимерацил; глоксазон; глуксифосфамид; гозерелина ацетат; гидроксимочевина; ибритумомаб/тиуксетан; идарубицин; ифосфамид; илмофозин; иломастат; иматиниб мезилат; имексон; импросульфид; индисулам; инпроквон (Inproquone); интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа; интерферон бета; интерферон гамма; интерфероны; интерлей-кин-2 и другие интерлейкины (в том числе, рекомбинантные интерлейкины); интоплицин; йобенгуан [131-1]; ипроплатин; иринотекан; ирсогладин; иксабепилон; кетотрексат; L-аланозин; ланреотид; лапати-ниб; ледоксантрон; летрозол; лейковорин; лейпролид; лейпролидин (лейпролид); левамизол; лексакаль-цитол; лиарозол; лобоплатин; лометрексол; ломустин/CCNU; ломустин; лонафарниб; лозоксантрон; лур-тотекан; мафосфамид; манноссульфид; маримастат; масопрокол; мехлорэтамин; мехлорэта-мин/хлорметин; мегестрола ацетат; мегестрол; мелнгестрол; мелфалан; мелфалан L-PAM; меногарил (Menogaril), мепитиостан; меркаптопурин; 6-меркаптопурин меркаптопурин; месна; метезинд (Metesind); метотрексат; метоксалан; метомидат; метоприн (Metoprine); метуредеп; мибоплатин (Miboplatin); ми-проксифен; мизонидазол; митиндомид; митокарцин; митокромин; митофлаксон; митогиллин; митогуа-зон; митомалцин; митомицин C; митомицины; митонафид; митокивон; митоспер; митотан; митоксан-трон; митозоломид; мивобулин; мизорибин; мофаротен; мопидамол; мубритиниб (Mubritinib); микофе-ноловая кислота; нандролон фенилпропионат; надаплатин; неларабин; неморубицин; нитракрин; нокода-зол; нофетумомаб (Nofetumomab); ногаламицин; нолатрексед; нортотриксантрон; октреотид; опрелвектин; ормаплатин; ортатаксел; отерацил; оксалиплатин; оксисуран (Oxisurean); оксофенарсин; паклитаксел; па-мидронат; патупилон (Patupilone); пегадемас (Pegademase); пэгаспаргаза; пэгфилграстим; пелдесин; пе-линомицин; пелитрексол; пеметрексед; пентамустин; пентостатин; пепломицин; перфосфамид; перифо-зин; пикоплатин; пинафид; пипоброман; пипосульфид; пирфенидон; пироксантрон; пиксантрон; плевит-рексед; пликамицин митрамицин; пликамицин; пломестан; пломестан; порфимер натрия; порфимер; порфирамицин; преднимустин; прокарбазин; пропамидин; проспидий; пумитепа; пурамицин; пиразофу-рин; хинакрин; ранимустин; расбуриказа; рибоприн; ритросульфид; ритуксимаб; роглетимид (Rogletimide); роквинимекс; руфокромомидин; сабарубицин; сафингол (Safingol); сарграмостим; сатрап-латин; себриплатин; семустин; семтразен; сизофиран; собузоксан; сорафениб; спарфозат; спарфозовая кислота; спарзомицин; спирогерманий; спирумустин; спирулатин; скваламин; стрептониридин; стрепто-варицин; стрептозоцин; суфосфамид (Sufosfamide); сулофенур; сунитиниба малат; 6-TG; тацединалин (Tacedinaline); тальк; тализомицин; таллимустин; тамоксифен; тариквидар; тауромустин; текогалан; те-гафур; телоксантрон; темопорфин; темозоломид; тенипозид/М-26; тенипозид; тероксирон (Tegoxirone); тизололидин-4-карбоновая кислота (Timonasic); тирапазамин; топиксантрон; топотекаин; торемифен; този-тумомаб; трабектедин (эктинэсайдин 743); трастузумаб; трестолон; третиноин/ATRA; трицирибин

(Ticiribine); трилостан; триметрексат; триплатина тетранитрат; трипторелин; трюфосфамид; тубулозол; убенимекс; урамустин; уредена; валрубидин; валсподар; вапреотид; вертепорфин; винбластин; винкристин; виндезин; винепидин (Viperidine); винфлуинин; винформид; винглицинат; винлейцинол; винлейролин; винорелбин; винросидин; винтриптол; винзолидин; ворозол; ксантомицин А (гуамециклин); зениплатин (Zeniplatin); зиласкорб [2-Н]; зиностатин; золедронат; зорубидин и зосукидар (Zosuquidar), например, алдеслейкин (например, PROLEUKIN®); алемтузумаб (например, CAMPATH®); алитретиноин (например, PANRETIN®); аллопуринол (например, ZYLOPRIM®); альтретамин (например, HEXALEN®); амифостин (например, ETHYOL®); анастрозол (например, ARIMIDEX®); триоксид мышьяка (например, TRISENOX®); аспарагиназа (например, ELSPAR®); живая вакцина БЦЖ (например, TICE® BCG); бексаротен (например, TARGRETIN®); бевацизумаб (AVASTIN®); блеомицин (например, BLENOXANE®); бусульфид для внутривенного введения (например, BUSULFEX®); бусульфид для перорального применения (например, MYLERAN™); калустерон (например, METHOSARB®); капецитабин (например, XELODA®); карбоплатин (например, PARAPLATIN®); кармустин (например, BCNU®, BiCNU®); кармустин с полифепрозаном (например, GLIADEL® Wafer); целекоксиб (например, CELEBREX®); хлорамбуцил (например, LEUKERAN®); цисплатин (например, PLATINOL®); кладрибин (например, LEUSTATIN®, 2-CdA®); циклофосфамид (например, CYTOXAN®, NEOSAR®); цитарабин (например, CYTOSAR-U®); цитарабин липосомальный (например, DepoCyt®); дакарбазин (например, DTIC-Domev); дактиномицин (например, COSMEGEN®); дарбэпоэтин альфа (например, ARANESP®); даунорубидин липосомальный (например, DAUNOXOME®); даунорубидин/дауномицин (например, CERUBIDINE®); денилейкин дифтитокс (например, ONTAK®); дексразоксан (например, ZINECARD®); доцетаксел (например, TAXOTERE®); доксорубидин (например, ADRIAMYCIN®, RUBEX®); доксорубидин липосомальный, в том числе доксорубидин HCl липосомальный для инъекций (например, DOXIL®); дромастанолон пропионат (например, DROMOSTANOLONE® и MASTERONE® для инъекций); растворы Elliott's B (например, Elliott's B Solution®); эпирубидин (например, ELLENCE®); эпоэтин альфа (например, EPOGEN®); эстрамустин (например, EMCYT®); этопозида фосфат (например, ETOPOPHOS®); этопозид VP-16 (например, VEPESID®); экземестан (например, AROMASIN®); филграстим (например, NEUPOGEN®); флоксуридин (например, FUDR®); флударабин (например, FLUDARA®); фторурацил, в том числе, 5-FU (например, ADRUCIL®); фулвестрант (например, FASLODEX®); гемцитабин (например, GEMZAR®); гемтузумаб/озогамицин (например, MYLOTARG®); гозерелина ацетат (например, ZOLADEX®); гидроксимочевина (например, HYDREA®); ибритумомаб/тиуксетан (например, ZEVALIN®); идарубидин (например, IDAMYCIN®); ифосфамид (например, IFEX®); иматиниб мезилат (например, GLEEVEC®); интерферон α-2a (например, ROFERON-A®); интерферон α-2b (например, INTRON A®); иринотекан (например, CAMPTOSAR®); летрозол (например, FEMARA®); лейковорин (например, WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); левамизол (например, ERGAMISOL®); ломустин/CCNU (например, SeeNU®); мехлорэтамин/хлорметин (например, MUSTARGEN®); мегестрола ацетат (например, MEGACE®); мелфалан/L-PAM (например, ALKERAN®); меркаптопурин, в том числе, 6-MP (например, PURINETHOL®); месна (например, MESNEX®); метотрексат; метоксален (например, UVADEX®); митомицин С (например, MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); митотан (например, LYSODREN®); митоксантрон (например, NOVANTRONE®); нандролон фенилпропионат (например, DURABOLIN-50®); нофетумомаб (например, VERLUMA®); опрелвекин (например, NEUMEGA®); оксалиплатин (например, ELOXATIN®); паклитаксел (например, PAXENE®, TAXOL®); памидронат (например, AREDIA®); пегадемас (например, ADAGEN®); пэгаспаргаза (например, ONCASPAR®); пэгфилграстим (например, NEULASTA®); пентостатин (например, NIPENT®); пипоброман (например, VERCYTE®); пликамицин/митрамицин (например, MITHRACIN®); порфимер натрия (например, PHTOFRIN®); прокарбазин (например, MATULANE®); хиначрин (например, ATABRINE®); расбуриказа (например, ELITEK®); ритуксимаб (например, RITUXAN®); сарграмостим (например, PROKINE®); стрептозоцин (например, ZANOSAR®); сунитиниб малат (например, SUTENT®); тальк (например, SCLEROSOL®); тамоксифен (например, NOLVADEX®); темозоломид (например, TEMODAR®); тенипозид/VM-26 (например, VUMON®); тестолактон (например, TESLAC®); тиогуанин, в том числе, 6-TG; тиотепа (например, THIOPLEX®); топотекан (например, HUCAMTIN®); торемифен (например, FARESTON®); тозитумомаб (например, BEXXAR®); трастузумаб (например, HERCEPTIN®); третиноин/АТРА (например, VESANOID®); урамустин; валрубидин (например, VALSTAR®); винбластин (например, VELBAN®); винкристин (например, ONCOVIN®); винорелбин (например, NAVELBINE®) и золедронат (например, ZOMETA®).

Например, примеры антибиотических агентов включают, но не ограничиваются ими, аминогликозиды; амфениколы; ансамицины; карбацефемы; карбапенемы; цефалоспорины или цефемы; цефамицины; клавамы; циклические липопептиды; диаминопиримидины; кетолиды; линкозамиды; макролиды; монобактамы; нитрофураны; оксацефемы; оксазолидиноны; пены, тиенамицины и прочие β-лактамы;

пенициллины; полипептидные антибиотики; хинолоны; сульфонамиды; сульфоны; тетрациклины и другие антибиотики (такие как клофоктол, фузидиевая кислота, гекседин (Hexedine), метенамин, нитрофурантоин, нитроксолин, ритипинем (Ritipenem), тауролидин, ксибомол (Xibomol)).

Также примеры терапевтических агентов включают факторы коагуляции и другие улучшители крови, такие как антигемофильный фактор, антиингибиторный коагулянтный комплекс, антитромбин III, фактор коагуляции V, фактор коагуляции VIII, фактор коагуляции IX, белковые фракции плазмы, факторы фон Виллебранда; антитромбоцитарные агенты (в том числе, например, абиксимаб, анагрелид, цилостазол, клопидогреля бисульфат, дипиридамола, эпопростенол, эптифибатид, тирофибан); колониестимулирующие факторы (КСФ) (в том числе, например, гранулоцитарный КСФ и гранулоцитарно-макрофагальный КСФ); стимуляторы эритропоэза (в том числе, например, эритропоэтины, такие как дарбэпоэтин альфа и эпоэтин альфа); кровоостанавливающие агенты и альбумины (в том числе, например, аprotинин, комбинации антигемофильных факторов и плазмы, десмопрессина ацетат и альбумины); иммуноглобулины, а также иммуноглобулины против гепатита В; ингибиторы тромбина (в том числе, например, прямые ингибиторы тромбина и лепирудин) и дротрекогин альфа; антикоагулянты (в том числе, например, дальтепарин, эноксапарин и другие гепарины и варфарин).

Примеры антител или других терапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, цетуксимаб (IMC-C225; Erbitux®); трастузумаб (Herceptin®); ритуксимаб (Rituxan®; MabThera®); бевацизумаб (Avastin®); алемтузумаб (Campath®; Campath-1H®; Mabcampath®); панитумумаб (ABX-EGF; Vectibix®); ранибизумаб (Lucentis®); ибритумомаб; ибритумомаб тиуксетан (Zevalin®); тозитумомаб; йод 1131 тозитумомаб (BEXXAR®); катумаксомаб (Removab®); гемтузумаб; гемтузумаб озогамидин (Mylotarg®); абатацепт (CTLA4-Ig; Oregenia®); белатацепт (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA); ипилимумаб (MDX-010; MDX-101); тремелиумаб (тицилимумаб; CP-675,206); PRS-010 (см., например, US 20090042785); PRS-050 (US 7585940; US 20090305982); афлиберцепт (VEGF Trap, AVE005; Holash et al., (2002) PNAS 99:11393-11398); волоциксимаб (M200); F200 (химерный (человеческий/мышинный) Fab фрагмент IgG4 волоциксимаба (M200)); MORAb-009 мышинный/человеческий химерный IgG1 (US 20050054048); растворимый белок слияния антимезотелин Fv, связанный с укороченным экзотоксином A Pseudomonas (SS1P (CAT-5001); US 20070189962); циксutumумаб (Cixutumumab) (IMC-A12); нимотузумаб (h-R3) (Spicer (2005) Curr Opin Mol. Ther 7:182-191); залутумумаб (Zalutumumab) (HuMax-EGFR; LaMMerts van Bueren et al. (2008) PNAS 105:6109-14); нецитумумаб (Necitumumab) IMC-11F8 (Li et al. (2008) Structure 16:216-227); Sym004 (Pedersen et al. 2010 Cancer Res 70:588-597) и mAb-425.

В частности, терапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, интерферон β , интерферон α -2, интерферон α -1, интерферон α -n3, интерферон β -1, интерферон β -1a, интерферон γ -1b, пэгинтерферон α -2 и пэгинтерферон α -2b, инсулин, бисфосфат (например, памидронаты или золедронаты), доцетакселы, доксорубицины, липосомальный доксорубин и бевацизумаб.

Другие примеры терапевтических агентов, которые могут быть комбинированы с помощью совместного введения и/или совместных лекарственных форм с предусмотренным в настоящем документе модифицированным полипептидом PH20, включают, но не ограничиваются ими, адалимумаб, агалсидаза бета, алефацепт, ампициллин, анакинра, вакцины против полиомиелита, антитимочитарные агенты, азитромицин, бекаплермин, каспофунгин, цефазолин, цефепим, цефотетан, цефтазидим, цефтриаксон, цетуксимаб, циластатин, клавулановая кислота, клиндамицин, дарбэпоэтин альфа, даклизумаб, дифтерия, дифтерийный антитоксин, дифтерийный анатоксин, эфализумаб, эпинефрин, эритропоэтин альфа, этанерцепт, филграстим, флуконазол, фолликулостимулирующие гормоны, фоллитропин альфа, фоллитропин бета, фосфенитоин, гадодиамид, гадопентетат, гатифлоксацин, глатирамер, ГМ-КСФ, гозерелин, гозерелина ацетат, гранисетрон, Haemophilus influenza B, галоперидол, вакцины против гепатита, вакцины против гепатита А, вакцины против гепатита В, ибритумомаб тиуксетан, ибритумомаб, тиуксетан, иммуноглобулины, вакцина против Haemophilus influenza, противогриппозные вакцины, инфликсимаб, инсулины, инсулин гларгин, интерфероны, интерфероны альфа, интерфероны бета, интерфероны гамма, интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерферон альфа-1, интерферон альфа-n3, интерфероны бета, интерфероны бета-1a, интерфероны гамма, интерферон альфа-консенсус, йодиксанол, йогексол, йопамидол, йоверсол, кеторолак, ларонидаза, левофлоксацин, лидокаин, линезолид, лоразепам, противокоревые вакцины, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вакцина против кори, эпидемического паротита и коревой краснухи, противокраснушные вакцины, медроксипрогестерон, меропенем, метилпреднизолон, мидазолам, морфин, октреотид, омализумаб, ондансетрон, паливизумаб, пантопразол, пэгаспаргаза, пэгфилграстим, пэг-интерферон альфа-2a, пэг-интерферон альфа-2b, пегвисомант, противокклюшные вакцины, пиперациллин, пневмококковые вакцины и конъюгированные пневмококковые вакцины, прометазин, ретепаза, соматотропин, сульбактам, суматриптан, тазобактам, тенектепаза, очищенный столбнячный анатоксин, тикарциллин, тозитумомаб, триамцинолон, триамцинолона ацетонид, триамцинолона гексацетонид, ванкомицин, иммуноглобулины для серотерапии ветряной оспы, вакцины против ветряной оспы, другие вакцины, алемтузумаб, алитретиноин, аллопуринол, альтретамиин, амифостин, анастрозол, мышьяк, триоксид мышьяка, аспарагиназа, противотуберкулезные вакцины Кальметта-Герена (БЦЖ), живая вакцина БЦЖ, бексаротен, блеомицин, бусульфат, бусульфат для внутривенного введения, бу-

сульфан для перорального применения, калустерон, капецитабин, карбоплатин, кармустин, кармустин с полифепрозаном, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитарабин, цитарабин липосомальный, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин липосомальный, даунорубицин, дауномицин, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, доцетаксел, доксорубицин, доксорубицин липосомальный, дромастанолон пропионат, растворы Elliott's B, эпирубицин, эпоэтин альфа, эстрамустин, этопозид, этопозид фосфат, этопозид VP-16, экземестан, флоксуридин, флударабин, фторурацил, 5-фторурацил, фулвестрант, гемцитабин, гемтузумаб, озогамицин, гемтузумаб озогамицин, гидроксимочевина, идарубицин, ифосфамид, иматиниб мезилат, иринотекан, летрозол, лейковорин, левамизол, ломустин, CCNU, мехлорэтамин, хлорметин, мегестрол, мегестрола ацетат, мелфалан, L-РАМ, меркаптопурин, 6-меркаптопурин, месна, метотрексат, метоксален, митомицины, митомицин С, митотан, митоксантрон, нандролон, нандролон фенолпропионат, нофетумомаб, опрелвекин, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат, пегадемас, пентостатин, пипоброман, пликамицин, митрамицин, порфирмер, порфирмер натрия, прокарбазин, хинакрин, расбуриказ, ритуксимаб, сарграмостим, стрептозоцин, тальк, тамоксифен, темозоломид, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, 6-тиогуанин, триэтилтиофосфорамида (тиотепа), топотекан, торемифен, трастузумаб, третиноин, урамустин, валрубицин, винбластин, винкристин, винорелбин, золедронат, ацивирин, аklarубицин, акодозол, акронин, адозелезин, алдеслейкин, ретиноевая кислота, алитретиноин, 9-цис-ретиноевая кислота, альвоцидид, амбазон, амбомицин, аметантрон, аминоклутетимид, амсакрин, анаксирон, анцитабин, антрамицин, апазиковон, аргимесна, асперлин, атримустин, азацитидин, азетепа, азотомицин, баноксантрон, батабулин, батимастат, бенаксипин, бендамустин, бензодеп (Benzodep), бикалутамид, биэтаксерпин, бирикодар, бисантрон, биснафида димезилат, бизелезин, бортезомиб, бреквинар, бропиримином, будотитан, кактиномицин, канертиниб, карацемид, карбетимер, карбоквон, кармофур, карубицин, карзелезин, цедефингол, цемадотин (Cemadotin), хлорамбуцил, циотеронел, циролемицин, кланфенур, клофарабин, кринатол, децитабин, декснигулдипин, дексормаплатин, дезагуанин, диаквон, диброспидий, диенгест, диналин, дисермолид, дофеквидар (Dofequidar), доксифлуридин, дролоксифен, дуазомицин, экомустин, эдатрексат, эдотекарин, эфлорнитин, элакридар (Elacridar), элинафид, элсамитруцин, эмитефур, энлоплатин, энпромат, энзастаурин, эпипропидин, эпталопрост, эрбулозол, эзорубицин, этанидазол, этоглуцид, этоприн, эксисулинд, фадрозол, фазарабин, фенретинид, флюоксиместерон, фторцитабин, фосквидон, фостриецин, фотретамин, галарубицин, галоцитабин, герохинол, гиматекан, гимерацил, глуксазон, глүфосфамид, илмофозин, иломастат, имексон, импросульфат, индисулам, инпроквон, интерлейкины, интерлейкин-2, рекомбинантные интерлейкины, интоплицин, йобенгуан, ипроплатин, ирсогладин, иксабепилон, кетотрексат, L-аланозин, ланреотид, лапатиниб, ледоксантрон, лейпролид, лейпрорелин, лексакальцитол, лиарозол, лобаплатин, лометрексол, лонафарниб, лозоксантрон, луртотекан, мафосфамид, манносульфат, маримастат, масопротексол, майтансин, мехлорэтамин, меленгестрол, мелфалан, меногарил, мепитиостан, метезинд, метомидат, метоприн, метуредеп, мибоплатин, мипроксифен, мизонидазол, митиндомид, митокарцин, митокромин, митофлаксол, митогиллин, митогуазон, митомалцин, митонафид, митоквидон, митоспер, митозоломид, мивобулин, мизорибин, мофаротен, мопидамол, мубритиниб, микофеноловая кислота, неаплатин, нейзарабин (Neizarabine), неморубицин, нитракрин, нокодазол, ногаламицин, нолатрексед, нортопиксантрон, ормаплатин, ортатаксел, отерацил, оксисуран, оксофенарсин, патупилон, пелдезин, пелиомицин, пелитрексол, пеметрексед, пентамустин, пепломицин, перфосфамид, перифозин, пикоплатин, пинафид, пипосульфат, пирфенидон, пироксантрон, пиксантрон, плевитрексед, плומестан, порфирамицин, преднимустин, пропамидин, проспидий, пумитепа, пурамицин, пиразофуридин, ранимустин, рибоприн, ритросульфат, роглетимид, роквинимекс, руфокромомидин, сабарубицин, сафингол, сатраплатин, себриплатин, семустин, семтразен, сизофиран, собузоксан, сорафениб, спарфозат, спарфозовая кислота (Sparfosic acid), спарзомицин, спирогерманий, спирумустин, спируплатин, скваламин, стрептонигрин, стрептоварицин, суфосфамид, сулофенур, тацедиалин, тализомицин, таллимустин, тариквидар, тауромустин, текогалан, тегафур, телоксантрон, темопорфин, тероксирон, тиамиприн (Thiamiprine), тиамиприн (Tiamiprine), тиазофуридин, тиломизол, тилорон, тимкодар, тиазолидин-4-карбоновая кислота (Timonasic), тирапазамин, топиксантрон, трабектедин, эктинзайдин 743, трестолон, трицирибин, трилостан, триметрексед, триплатина тетранитрат, трипторелин, трофосфамид, тубулозол, убенимекс, уредеп, валсподар, вапреотид, вертепорфин, винбластин, виндезин, винепидин, винфлунидин, винформид, винглицинат, винлейцинол, винлейросин, винросидин, винтриптол, винзолидин, ворозол, ксантомицин А, гуамециклин, зениплатин, зилакорб [2-Н], зиностатин, зорубицин, зосуквидар, ацетазоламид, ацикловир, адипиодон, алотрофлуксацин, альфентанил, аллерженные экстракты, ингибиторы альфа 1 -протеиназы, алпростадил, амикацин, аминокислоты, аминокaproновая кислота, аминофиллин, амитриптилин, амобарбитал, амирион, анальгетики, вакцины против полиомиелита, антирабическая сыворотка, противостолбнячные иммуноглобулины, противостолбнячные вакцины, антитромбин III, сыворотка против змеиного яда, аргатробан, аргинин, аскорбиновая кислота, атенолол, атракурий, атропин, ауротиоглюкоза, азатиоприн, азтреонам, бацитрацин, баклофен, базиликсимаб, бензойная кислота, бензтропин, бетаметазон, биотин, бивалирудин, ботулинические антиоксиданты, бретилий, буметанид, бупивакаин, бупренорфин, буторфанол, кальцитонин, кальцитриол, кальций, капуреомидин, карбопрост, карнитин, цефамандол, цефоперазон, цефотаксим, цефокситин, цефтизоксим, цефуроксим, хлорамфеникол, хлорпрокаин, хлорохин, хлортиазид, хлорпромазин, хондроитинсерная

кислота, хориогонадотропин альфа, хром, цидофовир, циметидин, ципрофлоксацин, цисатракурий, кло-нидин, кодеин, колхицин, колистин, коллаген, овечий кортикорелин трифлутат, кортикотропин, косин-тропин, цианокобаламин, циклоспорин, цистеин, дакликсимаб, дальфопристин, далтепарин, данапароид, дантролен, дефероксамин, десмопрессин, дексаметазон, дексмететомидин, декспантенол, декстран, дек-стран железа, диатризоевая кислота, диазепам, диазоксид, дицикломин, дигибинд, дигоксин, дигидроэр-готамин, дилтиазем, дифенгидрамин, дипиридамола, добутамин, допамин, доксакурий, доксапрам, док-серкальциферол, доксициклин, дроперидол, дифиллин, эдетовая кислота, эдрофоний, эналаприлат, эфед-рин, эпопростенол, эргокальциферол, эргоновин, эртапенем, эритромицин, эсмолол, эстрадиолы, эстро-гены, этакриновая кислота, этаноламин, этанол, этиодизированные масла, этидроновая кислота, этоми-дат, фактор VIII, фамотидин, фенолдопам, фентанил, флумазенил, фикоэритрины, флуфеназин, фолиевая кислота, фомепизол, фомивирсен, фондапаринукс, фоскарнет, фосфенитоин, фуросемид, гадотеридол, гадоверсетамид, ганцикловир, гентамицин, глюкагон, глюкоза, глицин, гликопирролат, гонадорелин, гонадотропин хорионический, полисахариды *Haemophilus B*, гемин, лекарственные препараты на основе трав, гистамины, гидралазин, гидрокортизон, гидроморфон, гидроксокобаламин, гидроксизин, гиосциа-мин, ибупрофен, имиглюцераза, индигокармин, индометацин, йодиды, йопромид, иоталамическая кислота, йоксагловая кислота, иоксилан (Ioxilan), изониазид, изопротеренол, вакцины против японского энцефа-лита, канамицин, кетамин, лабеталол, лепаирудин, левобупивакаин, левотироксин, линкомицин, лиотиро-нин, лютеинизирующие гормоны, вакцины против болезни Лайма, мангафодипир, ментолы, менингокок-ковые полисахаридные вакцины, меперидин, мепивакаин, мезоридазин, метараминол, метадон, метокар-бамол, метогекситал, метилдопат (Methyldopate), метилэргоновин, метоклопрамид, метопролол, метро-нидазол, миноциклин, мивакурий, смесь кислот из рыбьего жира, моксифлоксацин, муромонаб-CD3, ми-кофенолата мофетил, нафциллин, нальбуфин, налмефен, налоксон, неостигмин, ниаминамид, никарди-пин, нитроглицерины, нитропруссиды, норэпинефрины, орфенадрины, оксациллины, оксиморфоны, ок-ситетрациклины, окситоцины, панкуроний, пантенол, пантотеновая кислота, папаверин, пэгинтерферон-альфа (например, интерферон альфа 2a или 2b), пенициллин G, пентамидин, пентазоцин, пентобарбитал, перфлутрен (Perflutren), перфеназин, фенобарбитал, фентоламин, фенилэфрин, фенитоин, физостигмин, фитонадион, полимиксин b, пралидоксим, прилокаин, прокаинамид, прокаин, прохлорперазин, прогесте-роны, пропранолол, пиридопиримидин гидроксид, пиридоксин, хинидин, хинупристин, антирабические иммуноглобулины, вакцины против бешенства, рангитин, ремифентанил, рибофлавины, рифампицин, ропивакаин, самарий, скополамин, селен, серморелин, синкалид, соматрем, спектиномицин, стрептоки-наза, стрептомицин, сукцинилхолин, суфентанил, сульфаметоксазол, такролимус, тербуталин, терипара-тид, тестостерон, столбнячные антитоксины, тетракаин, тетрадецила сульфат, теofilлин, тиамин, ти-этилперазин, тиопентал, тиреостимулирующие гормоны, тинзапарин, тирофибан, тобрамицин, толазо-лин, толбутамид, торсемид (Torsemide), транексамовая кислота, трепростинил, трифлуоперазин, триме-тобензамид, триметоприм, трометамин, туберкулин, вакцины против брюшного тифа, урофоллитропин, урокиназа, вальпроевая кислота, вазопрессин, векуроний, верапамил, вориконазол, варфарин, вакцины против желтой лихорадки, зидовудин, цинк, зипразидона гидрохлорид, аклациномицин, актиномицин, адриамицин, азасерин, 6-азауридин, карциномицин, хромомицин, деноптерин, 6-диазо-5-окс-L-норлейцин, эноцитабин, флоксуридин, оливомидин, пирарубицин, пиритрексим, птероптерин, тегафур, туберцидин, алтеплаза, арцитумомаб (Arcitumomab), бевацизумаб, ботулинический токсин типа A, боту-линический токсин типа B, капромаб пендетид, даклизумаб, дорназа альфа, дротрекогин альфа, имциро-маб пентетат и йод-131.

Доставка инсулина.

Предусмотренные в настоящем документе способы включают способы совместного введения мо-дифицированного полипептида PH20 и инсулина для улучшения подкожной доставки инсулина, такого как быстродействующий инсулин (см., например, патент США № 7767429; патент США № 7846431; опубликованная заявка США № US 20090304665 и заявки США № 13/507263; 13/507262 и 13/507261). Такие способы включают способы прямого введения, а также помпы и способы непрерывной инфузии, в том числе системы без обратной связи и с обратной связью. Например, примерами инсулинов, которые могут быть введены с предусмотренной в настоящем документе модифицированной гиалуронидазой PH20, являются быстродействующие инсулины или аналоги инсулина. Например, совместно вводимые инсулины включают регулярный инсулин, инсулин аспарт, инсулин лизпро, инсулин глулизин или дру-гой аналогичный вариант аналога. Примерами инсулинов являются инсулины, которые содержат A-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 862, и B-цепь, приведенную в SEQ ID NO: 863, или варианты, которые со-держат одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению с инсулином человека, приве-денным в SEQ ID NO: 862 и 863 (A- и B-цепи). Например, примеры аналогов инсулина известны специа-листам в данной области техники и включают, не ограничиваясь этим, аналоги, которые приведены в SEQ ID NOS: 862 (A-цепь) и имеют B-цепь, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 865-867.

Совместные лекарственные формы можно вводить подкожно для лечения любого состояния, кото-рое поддается лечению инсулином. Терапевтические применения включают, не ограничиваясь этим, ле-чение сахарного диабета 1 типа, сахарного диабета 2 типа, гестационного диабета и гликемический кон-троль у больных в критическом состоянии. Например, совместные лекарственные формы быстродейст-

вующего инсулина и деградирующего гиалуронан фермента можно вводить подкожно в виде отдельных доз, например, посредством шприца или инсулинового шприца-ручки перед приемом пищи как прандиальную инсулиновую терапию у субъектов с диабетом для достижения гликемического контроля. Совместные лекарственные формы также можно вводить подкожно или внутривенно с использованием инсулиновой помпы или системы с обратной связью для непрерывного контроля уровня глюкозы в крови в течение дня и ночи и/или для контроля пост-прандиального колебания уровня глюкозы. Определение таких заболеваний или состояний находится в пределах компетенции лечащего врача.

Для любого заболевания или состояния, в том числе для всех заболеваний или состояний, приведенных в качестве примеров выше, для которых показано применение быстродействующего инсулина или для которых используется быстродействующий инсулин, и для которых доступны другие агенты и способы лечения, совместные лекарственные формы также можно использовать в комбинации с другими агентами и способами лечения. В зависимости от заболевания или состояния, подвергаемого лечению, примеры комбинаций включают, не ограничиваясь этим, комбинации с антидиабетическими лекарствами, включая, но не ограничиваясь этим, комбинации с сульфонилмочевинами, бигуанидами, меглитинидами, тиазолидиндионами, ингибиторами альфа-глюкозидаз, аналогами пептидов, в том числе с аналогами глюкагоноподобного пептида (GLP) и аналогами желудочного ингибиторного пептида (GIP), и ингибиторами DPP-4. В другом примере, совместные лекарственные формы быстродействующего инсулина и описанного в настоящем документе модифицированного полипептида PH20 можно вводить в комбинации, перед, с перерывом или после одного или нескольких других инсулинов, включая быстродействующий инсулин и базально действующий инсулин.

2. Способы лечения ассоциированных с гиалуронаном заболеваний и состояний (например, опухолей).

В частности, гиалуронидазу PH20 можно использовать для лечения ассоциированных с гиалуронаном заболеваний или состояний. Как правило, ассоциированные с гиалуронаном заболевания и состояния ассоциированы с повышенной экспрессией гиалуронана в ткани, клетке или биологической жидкости (например, в опухолевой ткани или ткани, ассоциированной с опухолью, в крови или в интерстициальном пространстве) по сравнению с контролем, например другой тканью, клеткой или биологической жидкостью. Повышенная экспрессия гиалуронана может быть повышена по сравнению с нормальной тканью, клеткой или биологической жидкостью, например, по сравнению с тканью, клеткой или биологической жидкостью, аналогичной тестируемому образцу, но выделенной из другого субъекта, например, из субъекта, который здоров (т.е. не имеет заболевания или состояния, или не имеет заболевания или состояния того же типа, которое имеет тестируемый субъект), например, у субъекта нет ассоциированного с гиалуронаном заболевания или состояния. Повышенная экспрессия гиалуронана может быть повышена по сравнению с аналогичной тканью из другого субъекта, который имеет аналогичное заболевание или состояние, но чье заболевание не является настолько серьезным и/или не является ассоциированным с гиалуронаном, или при котором экспрессируется сравнительно меньше гиалуронана и поэтому оно в меньшей степени ассоциировано с гиалуронаном. Например, тестируемым субъектом может быть субъект с ассоциированным с гиалуронаном раком, при котором количество HA в ткани, клетке или биологической жидкости относительно повышено по сравнению с субъектом, имеющим не такой тяжелый рак, например, рак на ранней стадии, дифференцированный или другой тип рака. В другом примере, клетка, ткань или биологическая жидкость содержит повышенные уровни гиалуронана по сравнению с контрольным образцом, таким как жидкость, ткань или экстракт (например, клеточный или ядерный экстракт), препарат нуклеиновой кислоты или пептидов, линия клеток, материал биопсии, стандарт или другой образец с известным количеством или относительным количеством HA, такой как образец, например, линии опухолевых клеток, экспрессирующей относительно низкие уровни HA, такой как, например, линии опухолевых клеток, описанные в настоящем документе и экспрессирующие низкие уровни HA, например, линия клеток HCT 116, линия клеток HT29, линия клеток NCI H460, линия клеток DU145, линия клеток Саран-1 и опухоли из моделей опухолей, полученные с использованием таких линий клеток.

Ассоциированные с гиалуронаном заболевания и состояния включают такие заболевания и состояния, которые ассоциированы с высоким давлением интерстициальной жидкости, такие как заболевания, ассоциированные с внутридискковым давлением, пролиферативные расстройства, такие как рак и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, и отеки. Отек может быть результатом, например, трансплантации органов, ударов или травм мозга или может проявляться, например, при трансплантации органов, ударе или травме мозга. Пролиферативные расстройства включают, но не ограничиваются ими, рак, пролиферацию гладкомышечных клеток, системный склероз, цирроз печени, синдром расстройства дыхания у взрослых, идиопатическую кардиомиопатию, системную красную волчанку, ретинопатию, например диабетическую ретинопатию или другие ретинопатии, гиперплазию сердца, расстройства, ассоциированные с репродуктивной системой, такие как доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ВРП) и кисты яичника, легочный фиброз, эндометриоз, фиброматоз, гамартома, лимфангиоматоз, саркоматоз, десмоидные опухоли. Рак включает солидные опухоли и опухоли лимфатической системы и крови, метастатические заболевания и недифференцированные опухоли. Опухоли, поддающиеся лечению, как правило, обладают клеточной и/или стромальной экспрессией гиалуронана, по сравнению с

не раковыми тканями того же тканевого типа или по сравнению с нематастатической опухолью того же типа опухоли. Рак включает любой один или несколько раков из группы рака яичников, карциномы *in situ* (ISC), плоскоклеточной карциномы (SCC), рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, других раков пищеварительного тракта, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака мозга и рака толстой кишки.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20, такие как их пегилированные формы, можно использовать для лечения опухолей. Таким образом, в дополнение к их непрямым противораковым эффектам, гиалуронидазы также имеют прямые антиканцерогенные эффекты. Гиалуронидаза предотвращает рост опухолей, трансплантированных мышам (De Maeyer et al., 1992, *Int. J. Cancer* 51:657-660), и ингибирует образование опухоли в результате воздействия канцерогенов (Pawlowski et al., 1979, *Int. J. Cancer* 23:105-109; Haberman et al., 1981, *Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, Washington, D.C., 22:105, abstract no. 415). Было показано, что гиалуронидаза PH20 лечит различные опухоли (см., например, опубликованная заявка США № US 2010/0003238 и заявка США № 13/135817, опубликованная как заявка США № US 20120020951).

Богатый гиалуронатом рак может представлять собой рак, при котором раковые клетки продуцируют гало, рак, который имеет повышенную экспрессию гиалуронана (определенную с помощью иммуноокрашивания, например, гистологического окрашивания срезов опухоли), рак, который имеет повышенный уровень HAS2 (гиалуронан синтаза 2), рак, который не продуцирует гиалуронидазу (HYAL1) *in vitro*. Богатый гиалуронатом рак можно идентифицировать любым способом оценки экспрессии гиалуронана и другим известным способом оценки экспрессии белка/мРНК.

Было идентифицировано несколько богатых гиалуронатом раков. В некоторых случаях, экспрессия гиалуронана коррелирует с неблагоприятным прогнозом, например с пониженным коэффициентом выживаемости и/или безрецидивной выживаемости, метастазированием, ангиогенезом, инвазией раковых клеток в другие области, другими индикаторами неблагоприятного прогноза. Такие корреляции наблюдались, например, для ассоциированных с гиалуронатом опухолей, в том числе для рака яичников, SCC, ISC, рака предстательной железы, рака легкого, в том числе для немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака молочной железы, рака толстой кишки и рака поджелудочной железы (см., например, Anttila 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)). Таким образом, богатый гиалуронатом рак можно лечить путем введения гиалуронидазы, такой как растворимая PH20, для лечения одного или нескольких симптомов рака. Богатые гиалуронатом опухоли включают, не ограничиваясь ими, богатые гиалуронатом опухоли предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, яичников, желудка, головы и шеи и другие опухоли и виды рака.

Другие ассоциированные с гиалуронатом заболевания или состояния, ассоциированные с избытком гликозаминогликанов, и которые можно лечить с помощью предусмотренного в настоящем документе модифицированного полипептида PH20, включают, не ограничиваясь ими, сердечно-сосудистые заболевания (например, после ишемии/реперфузии; при атеросклерозе); витректомию и офтальмологические заболевания и состояния (например, применение в способах разжижения эндолимфы глаза; снижения послеоперационного давления; при других глазных операциях, таких как операции по поводу глаукомы, хирургия стекловидного тела и сетчатки, трансплантация роговицы); подкожное вливание (т.е. инфузия жидкостей и электролитов в гиподерму кожи); косметические применения (например, для лечения целлюлита, "свиной кожи" или "апельсиновой корки"); трансплантацию органов (например, ассоциированную с интерстициальными отеками в связи с трансплантацией органа); легочные заболевания.

3. Другие применения.

В других примерах их терапевтического применения предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут использоваться для таких целей как применение в качестве антитода при локальном некрозе, вызванном околососудистой инъекцией некротических веществ, таких как алкалоиды барвинка (Few et al. (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26), лечение ганглиозных кист (Paul et al. (1997) *J. Hand Surg.* 22 (2): 219-21) и лечение некроза тканей, вызванного венозной недостаточностью (Elder et al. (1980) *Lancet* 648-649). Модифицированные полипептиды PH20 также могут использоваться для лечения ганглиозных кист (также известных как кисты запястного сустава, библейская киста), являющихся наиболее распространенными опухолевидными образованиями рук и представляющих собой заполненные жидкостью полости (капсулы), которые могут располагаться под кожей.

Модифицированные полипептиды PH20 могут использоваться для лечения повреждений спинного мозга с помощью деградациии хондроитинсульфат протеогликанов (CSPGs). После повреждения спинного мозга астроциты образуют глиальные рубцы, содержащие CSPGs. CSPGs играют решающую роль в ингибировании роста аксона. Кроме того, было показано, что экспрессия CSPG увеличивается после повреждений центральной нервной системы (ЦНС). Растворимый PH20 также можно использовать для лечения грыжи межпозвоночных дисков с помощью процесса, известного как хемонуклеолиз. Хондроитиназа ABC, фермент, расщепляющий субстраты, аналогичные субстратам гиалуронидазы, может вызвать снижение внутридискового давления в поясничном отделе позвоночника. Существует три типа повреж-

дений дисков. При интрузии межпозвонковых дисков диски не повреждены, но выпячены. При экструзии межпозвонкового диска разрывается фиброзное кольцо, и ПЯ (пульпозное ядро) начинает выпячиваться наружу, но всё еще остается связанным с диском. В случае секвестрированного диска фрагмент ПЯ уже вышел из диска и оказывается в свободном виде в спинно-мозговом канале. Хемонуклеолиз, как правило, эффективен при интрузии и экструзии межпозвонковых дисков, но не при секвестрированных повреждениях (секвестрированной грыже) дисков.

4. Контрацепция.

Предусмотренные в настоящем документе модифицированные полипептиды PH20 могут использоваться в качестве вакцин для применения в контрацепции. PH20 находится в мужском репродуктивном тракте и экспрессируется как в семенниках, так и в эпидидимусе, и находится в сперме. PH20 играет роль в оплодотворении, усиливая проникновение сперматозоида через кумулюсный слой, окружающей неоплодотворенную яйцеклетку. PH20 также может связываться с гиалуроновой кислотой (НА) в блестящей оболочке на ранних стадиях оплодотворения. Связывание также инициирует внутриклеточную сигнализацию, что способствует акросомной реакции. На самцах морских свинок было показано, что иммунизация PH20 является эффективным средством контрацепции (Primakoff et al. (1988) Nature 335:543-546, Tung et al. (1997) Biol. Reprod. 56:1133-1141). Также было показано, что это является эффективным средством контрацепции для самок морских свинок, вследствие образования анти-PH20 антител, которые предотвращают связывание сперматозоида и яйцеклетки. В примерах в настоящем документе, модифицированные полипептиды PH20 могут представлять собой неактивные ферменты, такие как любые ферменты, описанные в разделах С.2. Полипептиды могут вводиться непосредственно или могут вводиться в виде рекомбинантного вируса для доставки антигена.

Примеры

Следующие примеры включены только как иллюстративный материал и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Получение рекомбинантной человеческой гиалуронидазы PH20 (rHuPH20).

А. Создание клеточной линии, экспрессирующей растворимую rHuPH20.

Рекомбинантную человеческую гиалуронидазу PH20, обозначенную rHuPH20, получали, как описано в опубликованной заявке США US 20110053247. Плазмиду pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) (представленную в SEQ ID NO:5) использовали для трансфекции клеток яичника китайского хомячка (линия клеток CHO) (см., например, патенты США №№ 776429 и 7871607 и опубликованную заявку США 2006-0104968). Плазмидный вектор HZ24 для экспрессии растворимой rHuPH20 содержит каркас вектора pCI (Promega), ДНК, кодирующую аминокислоты 1-482 человеческой гиалуронидазы PH20 (SEQ ID NO:2), внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) из вируса ЕСМV (Clontech) и ген дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR). Каркас вектора pCI также включает в себя ДНК, кодирующую ген β -лактамазы, обеспечивающей устойчивость к антибиотику (AmpR), ориджин репликации fl, немедленно-ранний энхансер/промотор цитомегаловируса (CMV), химерный интрон и поздний сигнал полиаденилирования SV40. ДНК-конструкция, кодирующая растворимую rHuPH20, содержит сайт NheI и консенсусную последовательность Козака, затем последовательность, кодирующую метионин в аминокислотной позиции 1 природной 35-аминокислотной сигнальной последовательности человеческой PH20, а после последовательности ДНК, кодирующей тирозин, соответствующий аминокислоте в позиции 482 человеческой гиалуронидазы PH20, представленной в SEQ ID NO:2, также включает стоп-кодон, а после него - сайт рестрикции BamHI.

Нетрансфицированные клетки DG44 CHO, растущие в модифицированной CD-CHO среде GIBCO для DHFR(-) клеток, содержащей 4 мМ глутамин и 18 мл/л Plurionic F68/L (Gibco), высевали по $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в шейкерную колбу для подготовки к трансфекции. Клетки выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе при встряхивании 120 об/мин. Экспоненциально растущие нетрансфицированные клетки DG44 CHO проверяли на жизнеспособность перед трансфекцией.

Шестьдесят миллионов жизнеспособных клеток из культуры не трансфицированных DG44 CHO клеток осаждали и ресуспендировали до плотности 2×10^7 клеток в 0,7 мл 2-кратного трансфекционного буфера (2xHeBS: 40 мМ HEPES, pH 7,0, 274 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,4 мМ Na₂HPO₄, 12 мМ декстрозы). К каждой аликвоте ресуспендированных клеток было добавлено 0,09 мл (250 мкг) линейаризованной плазмиды HZ24 (рестрикция в течение ночи ферментом Cla I (New England Biolabs)), и суспензии клеток/ДНК были перенесены в кюветы для электропорации, 0,4 см ВТХ (Gentronics), при комнатной температуре. Отрицательный контроль электропорации проводили без добавления плазмидной ДНК к клеткам. Смесь плазмиды/клетки электропорировали разрядом конденсатора с параметрами 330 В и 960 мкФ или 350 В и 960 мкФ.

После электропорации клетки переносили из кюветы в 5 мл модифицированной CD-CHO среды для DHFR(-) клеток, содержащей 4 мМ глутамин и 18 мл/л Plurionic F68/L (Gibco), и культивировали в 6-луночном планшете без селективного антибиотика в течение 2 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе.

Через два дня после электропорации из каждой лунки отбирали 0,5 мл культуральной среды и про-

веряли ее на наличие активности гиалуронидазы с применением микротурбидиметрического метода, описанного в примере 8. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Начальная активность гиалуронидазы, полученной в клетках DG44 CHO, трансфицированных HZ24, через 40 ч после трансфекции

	Разведение	Активность (ед/мл)
Трансфекция 1 330В	1:10	0,25
Трансфекция 2 350В	1:10	0,52
Отрицательный контроль	1:10	0,015

Клетки после трансфекции 2 (350В) были отделены от культуральной среды, подсчитаны и разбавлены до $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$ жизнеспособных клеток на 1 мл. Аликвоту 0,1 мл клеточной суспензии переносили в каждую из лунок пяти 96-луночных круглодонных планшетов для культивирования клеток. В каждую лунку с клетками было добавлено 100 мкл среды CD-CHO (GIBCO), содержащей 4 mM GlutaMAX™-1 (GIBCO™, Invitrogen Corporation) и не содержащей гипоксантина и тимидина (конечный объем 0,2 мл). Идентифицировали десять клонов из 5 планшетов, культивированных без метотрексата.

Таблица 7

Активность гиалуронидазы в идентифицированных клонах

Планшет/лунка ID	Относительная активность гиалуронидазы
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

Шесть клонов HZ24 выращивали в культуре и переносили в шейкерные колбы в виде суспензий. Клоны 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 и 4D10 высевали в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования клеток методом бесконечного разбавления, при котором клетки разводили в лунках планшета 1:2 сверху вниз и 1:3 слева направо, начиная с 5000 клеток в верхней левой лунке. Разбавленные клоны выращивали вместе с 500 нетрансфицированными клетками DG44 CHO на лунку, чтобы обеспечить наличие необходимых ростовых факторов для начальных дней в культуре. Для субклонирования было подготовлено десять планшетов, причём 5 планшетов содержали 50 нМ метотрексата и 5 планшетов были без метотрексата.

Клон 3D3 произвёл 24 видимых субклона (13 на планшете без метотрексата и 11 на планшете с 50 нМ метотрексата). Значительная активность гиалуронидазы была определена в супернатантах 8 из 24 субклонов (>50 Ед/мл), и эти восемь субклонов выращивали в культуральных матрасах Т-25. Клоны, выделенные после обработки метотрексатом, выращивали в присутствии 50 нМ метотрексата. Клон 3D35M растили в присутствии 500 нМ метотрексата, что привело к образованию клонов, продуцирующих более 1000 Ед/мл гиалуронидазы в шейкерных колбах (клон 3D35M или Gen1 3D35M). Из клеток 3D35M затем был получен эталонный банк клеток (МСВ).

В. Получение клеток Gen2, содержащих растворимую человеческую PH20 (rHuPH20).

Клеточная линия Gen1 3D35M, описанная в примере 1.А, была адаптирована к более высоким уровням метотрексата, что привело к образованию клонов 2 поколения (Gen2). Клетки 3D35M высевали из культуры, культивируемой в присутствии метотрексата, в среду CD-CHO, содержащую 4 mM GlutaMAX-1™ и 1,0 мкМ метотрексата. Клетки были адаптированы к более высокому уровню метотрексата путем выращивания их в течение 9 пассажей (46 дней) при 37°C, 7% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Из выращенной популяции клеток были получены клоны путем предельного разведения культуры в 96-луночных планшетах, содержащих среду с 2,0 мкМ метотрексата. Примерно через 4 недели клоны идентифицировали и клон 3E10В был выбран для выращивания. Клетки 3E10В выращивали в среде CD-CHO, содержащей 4 mM GlutaMAX-1™ и 2,0 мкМ метотрексата, в течение 20 пассажей. Из клеточной линии 3E10В был создан и заморожен эталонный банк клеток (МСВ), который можно использовать для последующих исследований.

Размножение клеточной линии продолжали, культивируя клетки 3E10В в среде CD-CHO, содержащей 4 mM GlutaMAX-1™ и 4,0 мкМ метотрексата. После 12-го пассажа клетки были заморожены в пробирках как банк клеток для исследований (RCB). Одну пробирку из RCB оттаивали и культивировали в среде, содержащей 8,0 мкМ метотрексата. Через 5 дней концентрация метотрексата в среде была увели-

чена до 16,0 мкМ, а затем до 20,0 мкМ через 18 дней. Клетки после восьмого пассажа в среде, содержащей 20,0 мкМ метотрексата, были клонированы методом предельного разведения культуры в 96-луночных планшетах со средой CD-CHO, содержащей 4 мМ GlutaMAX-1™ и 20,0 мкМ метотрексата. Клоны были идентифицированы 5-6 недель спустя, и клон 2B2 был выбран для выращивания в среде, содержащей 20,0 мкМ метотрексата. После 11-го пассажа клетки 2B2 были заморожены в пробирках как банк клеток для исследований (RCB).

Полученные клетки 2B2 являются дефицитными по дигидрофолатредуктазе (dhfr-) клетками DG44 CHO, которые экспрессируют растворимый рекомбинантный человеческий белок РН20 (gHuРН20). Растворимая РН20 присутствует в клетках 2B2 в количестве примерно 206 копий/клетка. Саузерн-блот анализ геномной ДНК клеток 2B2, обработанной эндонуклеазами рестрикции SpeI, XbaI и BamHI/HindIII, с применением gHuРН20-специфической пробы показал следующий профиль рестрикции: одна крупная гибридизованная полоса ~7,7 тысяч пар оснований и четыре меньших гибридизованных полосы (~13,9, ~6,6, ~5,7 и ~4,6 тысяч пар оснований) при обработке SpeI; одна крупная гибридизованная полоса ~5,0 тысяч пар оснований и две меньших гибридизованных полосы (~13,9 и ~6,5 тысяч пар оснований) при обработке XbaI; и единственная гибридизованная полоса ~1,4 тысяч пар оснований, наблюдаемая при обработке ДНК 2B2 эндонуклеазами рестрикции BamHI/HindIII.

С. Получение Gen2 растворимой gHuРН20 в 300 л биореакторе для культивирования клеток.

Пробирку HZ24-2B2 оттаивали и клетки выращивали, начиная с шейкерных колб до вращающейся колбы объемом 36 л в среде CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) с добавлением 20 мкМ метотрексата и GlutaMAX-1™ (Invitrogen). Коротко, пробирку клеток оттаивали на водяной бане при 37°C, добавляли среду и клетки центрифугировали. Клетки ресуспендировали в 125 мл вращающейся колбе с 20 мл свежей среды и помещали на 37°C при 7% CO₂ в инкубатор. Клетки выращивали в 40 мл среды в 125 мл вращающейся колбе. Когда плотность клеток достигла более чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру поместили в 125 мл вращающуюся колбу с 100 мл культуральной среды. Колбу инкубировали при 37°C, 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла более чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру перенесли в 250 мл вращающуюся колбу с 200 мл культуральной среды; колбу инкубировали при 37°C, 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла более чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру перенесли в 1 л вращающуюся колбу с 800 мл культуральной среды и инкубировали при 37°C, 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла более чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру перенесли в 6 л вращающуюся колбу с 5000 мл культуральной среды, клетки инкубировали при 37°C, 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла более чем $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру перенесли в 36 л вращающуюся колбу с 32 л культуральной среды и инкубировали при 37°C, 7% CO₂.

400 л реактор стерилизовали и добавляли 230 мл среды CD-CHO. Перед применением реактор был проверен на загрязнения. Примерно 30 л суспензии клеток переносили из вращающихся 36 л колб в 400 л биореактор (Braun) при плотности посевного материала $4,0 \times 10^5$ жизнеспособных клеток на 1 мл, общий объем 260 л. Были заданы параметры: температура 37°C; скорость мешалки 40-55 об/мин; давление в резервуаре 3 пси; барботаж воздуха 0,5-1,5 л/мин; поток воздуха над средой 3 л/мин. Реактор ежедневно проверяли на количество клеток, pH, состав среды, получение и накопление белка. Кроме того, во время работы реактора добавляли питательные вещества. Через 120 ч (5 дней) было добавлено 10,4 л питательной среды № 1 (4×CD-CHO + 33 г/л глюкозы + 160 мл/л Glutamax-1™ + 83 мл/л Yeastolate + 33 мг/л рекомбинантного человеческого инсулина). Через 168 ч (7 дней) было добавлено 10,8 л питательной среды № 2 (2×CD-CHO + 33 г/л глюкозы + 80 мл/л Glutamax-1™ + 167 мл/л Yeastolate + 0,92 г/л бутирата натрия), а температура культуры была изменена до 36,5°C. Через 216 ч (9 дней) было добавлено 10,8 л питательной среды № 3 (1×CD-CHO + 50 г/л глюкозы + 50 мл/л Glutamax-1™ + 250 мл/л Yeastolate + 1,80 г/л бутирата натрия), а температура культуры была изменена до 36°C. Через 264 ч (11 дней) было добавлено 10,8 л питательной среды № 4 (1×CD-CHO + 33 г/л глюкоза + 33 мл/л Glutamax-1™ + 250 мл/л Yeastolate + 0,92 г/л бутирата натрия), а температура культуры была изменена до 35,5°C. Добавление питательной среды приводило к резкому повышению продукции растворимой gHuРН20 на заключительных этапах получения. Реактор использовали в течение 14 или 15 дней или до тех пор, пока жизнеспособность клеток не падала ниже 40%. Процесс привел к конечной производительности 17000 единиц на 1 мл с максимальной плотностью 12 миллионов клеток/мл. В конце процесса культуру анализировали на наличие микоплазмы, биологического загрязнения, эндотоксинов и вирусов *in vitro* и *in vivo*; образцы были отобраны для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) и определения активности фермента.

Культуру прокачивали перистальтическим насосом параллельно через четыре модуля системы фильтрации Millistak (Millipore), каждый из которых содержит слой диатомовой земли фракции 4-8 мкм, и слой диатомовой земли фракции 1,4-1,1 мкм, после которых расположена целлюлозная мембрана, затем через единственный модуль второй системы фильтрации Millistak (Millipore), содержащей слой диатомовой земли фракции 0,4-0,11 мкм и слой диатомовой земли фракции <0,1 мкм, после которых расположена целлюлозная мембрана, а затем через последний 0,22 мкм фильтр в стерильный одноразовый гибкий мешок емкостью 350 л. В собранную культуральную жидкость добавляли ЭДТА до 10 мМ и трис до 10 мМ, pH 7,5. Культуральная жидкость была сконцентрирована в 10 раз с помощью устройства тангенциальной проточной фильтрации (ТФФ), использующего четыре полиэфирсульфоновых (PES) фильтра

Sartoslice TFF (Sartorius) с пределом исключения молекулярной массы (MWCO) 30 кДа, затем буфер 10× заменяли на 10 мМ трис, 20 мМ Na₂SO₄, pH 7,5 и жидкость пропускали через фильтр на 0,22 мкм в 50 л стерильный мешок для хранения.

Концентрированную диафильтрованную жидкость подвергли обработке для инактивации вирусов. Перед инактивацией вирусов был приготовлен раствор, содержащий 10% Тритон X-100 и 3% три-(н-бутил)фосфата (TNBP). Концентрированную диафильтрованную жидкость обрабатывали 1% Тритон X-100, 0,3% TNBP в течение 1 ч в 36 л стеклянном реакционном сосуде непосредственно перед очисткой на колонке Q.

D. Очистка растворимой gHuPH20 Gen2.

Была подготовлена ионообменная колонка с Q-сефарозой (Pharmacia) (9 л смолы, H=29 см, D=20 см). Образцы после промывания колонки были отобраны для определения pH, электропроводности и содержания эндотоксина (LAL-анализ). Колонку уравнивали 5 объемами колонки 10 мМ трис, 20 мМ Na₂SO₄, pH 7,5. После инактивации вирусов жидкость концентрировали, подвергали диафильтрации и загружали на колонку Q при скорости потока 100 см/ч. Колонку промывали 5 об. колонки 10 мМ трис, 20 мМ Na₂SO₄, pH 7,5 и 10 мМ Hepes, 50 мМ NaCl, pH 7,0. Белок элюировали 10 мМ Hepes, 400 мМ NaCl, pH 7,0 через конечный фильтр 0,22 мкм в стерильный мешок. Образец элюата проверяли на биологическое загрязнение, концентрацию белка и активность гиалуронидазы. В начале и в конце ионообменной хроматографии была определена абсорбция A₂₈₀.

Затем проводили гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе (Pharmacia). Была подготовлена колонка (19-21 л смолы, H=29 см, D=30 см) с фенил-сефарозой (PS). Образцы после промывания колонки собирали для определения pH, электропроводности и эндотоксина (LAL-анализ). Колонку уравнивали 5 об. колонки 5 мМ фосфата калия, 0,5 М сульфата аммония, 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0. К элюату белка с колонки с Q-сефарозой были добавлены исходные растворы 2М сульфат аммония, 1 М фосфата калия и 1 М CaCl₂ для получения конечных концентраций 5 мМ, 0,5 М и 0,1 мМ соответственно. Белок наносили на колонку с PS при скорости потока 100 см/ч и жидкость на выходе собирали. Колонку промывали раствором, содержащим 5 мМ фосфата калия, 0,5 М сульфата аммония и 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0 при скорости 100 см/ч, и промывочный раствор также собирали. Вместе с жидкостью от промывания колонки всю прошедшую через колонку жидкость пропускали через конечный 0,22 мкм фильтр и собирали в стерильный мешок. Образцы отбирали для определения биологического загрязнения, концентрации белка и активности фермента.

Готовили колонку с аминоксифенилборонатом (ProMedics). Образцы после промывания колонки собирали и определяли pH, электропроводность и наличие эндотоксина (LAL-анализ). Колонку уравнивали 5 объемами колонки раствора, содержащего 5 мМ фосфата калия, 0,5 М сульфата аммония. Жидкость, прошедшую через PS и содержащую очищенный белок, наносили на колонку с аминоксифенилборонатом при скорости потока 100 см/ч. Колонку промывали раствором, содержащим 5 мМ фосфата калия, 0,5 М сульфат аммония, pH 7,0. Колонку промывали раствором, содержащим 20 мМ бисина, 0,5 М сульфата аммония, pH 9,0. Колонку промывали раствором, содержащим 20 мМ бисина, 100 мМ хлорида натрия, pH 9,0. Белок элюировали 50 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, pH 6,9 и пропускали через стерильный фильтр в стерильный мешок. Образцы элюата были проанализированы на биологическое загрязнение, концентрацию белка и активность фермента.

Была подготовлена колонка с гидроксипатитом (HAP) (BioRad). Промывочную жидкость собирали и определяли pH, электропроводность и наличие эндотоксина (LAL-анализ). Колонку уравнивали раствором, содержащим 5 мМ фосфата калия, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0. В жидкость, полученную после хроматографии на колонке с аминоксифенилборонатом, и содержащую очищенный белок, добавляли фосфат калия и CaCl₂ до конечных концентраций 5 мМ и 0,1 мМ соответственно и наносили на колонку с HAP при скорости потока 100 см/ч. Колонку промывали раствором, содержащим 5 мМ фосфата калия, pH 7, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂. Затем колонку промывали раствором, содержащим 10 мМ фосфат калия, pH 7, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂. Белок элюировали 70 мМ фосфата калия, pH 7,0 и элюат пропускали через 0,22 мкм стерильный фильтр в стерильный мешок. Образец элюата анализировали на биологическое загрязнение, концентрацию белка и активность фермента.

Затем очищенный на HAP белок пропускали через фильтр для удаления вирусных частиц. Сначала был подготовлен стерильный фильтр Viosart (Sartorius) промыванием 2 л раствора 70 мМ фосфата калия, pH 7,0. Перед применением фильтровали буфер и отбирали образцы для определения pH и проводимости. Очищенный на HAP белок пропускали с помощью перистальтического насоса через фильтр с размером пор 20 нМ для удаления вируса. Фильтрованный белок в 70 мМ фосфата калия, pH 7,0 пропускали через конечный 0,22 мкм фильтр в стерильный мешок. В образце, подвергнутом фильтрации для удаления вирусов, определяли концентрацию белка, активность фермента, концентрацию олигосахаридов, моносахаридов и сиаловой кислоты. Образец также тестировали на наличие примесей, связанных с процессом получения белка.

Белок в фильтрате затем концентрировали до 10 мг/мл с применением системы тангенциальной проточной фильтрации (TFF) Sartocoon Slice (Sartorius), отсекающей частицы с молекулярной массой до 10 кДа (MWCO). Сначала фильтр был подготовлен промыванием раствором, содержащим 10 мМ гисти-

дина, 130 mM NaCl, pH 6,0, и в фильтрате были определены pH и проводимость. После концентрирования отбирали образец и определяли концентрацию белка и активность фермента. В образце концентрированного белка проводили 6× замену буфера до конечной концентрации 10 mM гистидина, 130 mM NaCl, pH 6,0. После замены буфера концентрированный белок пропускали через 0,22 мкм фильтр в 20 л стерильный мешок для хранения. Отбирали образец белка и определяли его концентрацию, ферментативную активность, концентрацию свободных сульфгидрильных групп, олигосахаридов и осмотическое давление. В описанных ниже анализах образец WRS2 использовали в качестве стандартного образца, результаты анализа на внешний вид образца показали, что он был прозрачный и бесцветный; pH составлял 7,4; уровень эндотоксина составлял <0,01 EU/мл; осмолярность составляла 308 мОсм/кг; плотность составляла 1,005 г/мл; содержание гHuPH20 составляло 1,3 миллионов частей; гиалуронидазная активность составляла 145 Ед USP/мл.

Стерильную фильтрованную массу белка затем асептически дозировали по 20 мл в 30 мл стерильные флаконы Teflon (Nalgene). Флаконы затем быстро замораживали и хранили при $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Пример 2. Создание библиотеки мутантов PH20.

А. Клонирование и мутагенез.

В этом примере была создана библиотека человеческой гиалуронидазы PH20 путем клонирования ДНК, кодирующей человеческую PH20, в плазмиду с последующими трансфекцией и экспрессией белка.

Библиотека была создана путём мутагенеза последовательности PH20, которая является кодон-оптимизированной версией PH20 с лидерной последовательностью Igk. В частности, для создания библиотеки вариантов в качестве матрицы был использован экспрессионный вектор HZ24-PH20(OHO)-IRES-SEAP (представлен в SEQ ID NO:4), который содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую PH20, приведенную в SEQ ID NO:1, которая кодирует предшественник PH20, приведенный в SEQ ID NO:2, или зрелую PH20, приведенную в SEQ ID NO:3, в которой отсутствуют остатки 1-22, соответствующие сигнальной последовательности Igk. Структура вектора была получена из исходного вектора HZ24, содержащего селективный маркер DHFR (см. пример 1 и SEQ ID NO:5), добавлением дополнительной лидерной последовательности Igk и оптимизацией кодонов. Экспрессионный вектор также был модифицирован для включения в него гена секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Таким образом, в дополнение к последовательности, кодирующей PH20, экспрессионный вектор HZ24-PH20(OHO)-IRES-SEAP содержит также внутренний сайт посадки рибосомы (EMCV IRES), который связан с кодирующей последовательностью гена секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP), и единственный промотор CMV, который направляет экспрессию PH20 и SEAP в конструкции. Он также содержит ген устойчивости к ампициллину. В соответствии с последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:4, последовательность нуклеотидов, кодирующих PH20, соответствует нуклеотидам 1058-2464 (включая лидерную последовательность Igk), последовательность нуклеотидов, кодирующих SEAP, соответствует нуклеотидам 2970-4529, и ген устойчивости к ампициллину соответствует нуклеотидам 5778-6635.

Первая библиотека была получена для получения закодированных вариантов белков, в которых каждый из остатков 23-469 в SEQ ID NO: 2 (соответствуют остаткам 1-447 в SEQ ID NO: 3 или остаткам 36-482 в SEQ ID NO: 6) был заменён на один из приблизительно 15 аминокислотных остатков таким образом, что каждый белок содержал одну аминокислотную замену. В результате библиотека содержала 6753 варианта, каждый из которых содержал мутацию одной аминокислоты по сравнению с остатками 23-469 в SEQ ID NO: 2 (соответствуют остаткам 1-447 в SEQ ID NO: 3 или остаткам 36-482 в SEQ ID NO: 6). Были приготовлены образцы полученной библиотеки в глицерине, которые хранили при -80°C . Замены аминокислот (mut) в каждом варианте приведены ниже в табл. 8 и соответствуют аминокислотным заменам со ссылкой на последовательность аминокислот PH20, приведенную в SEQ ID NO: 3 (и SEQ ID NO: 7 или 32-66, которые являются последовательностями зрелой PH20 или других ее укороченных с С-конца фрагментов). Соответствующие мутантные кодоны (cod) каждого варианта PH20 в библиотеке также приведены в табл. 8 и соответствуют нуклеотидным заменам в соответствующей кодирующей последовательности PH20, приведенной как остатки 1058-2464 в SEQ ID NO: 4. Каждый вариант был экспрессирован и проскринирован на активность гиалуронидазы, что описано ниже.

Варианты PH20

mut	cod										
L001A	GCG	Y066S	AGT	R132N	AAT	G198T	ACT	V265G	GGT	I331K	AAG
L001C	TGT	Y066T	ACG	R132P	CCT	G198V	GTT	V265H	CAT	I331L	CTG
L001D	GAT	Y066V	GTG	R132Q	CAG	G198W	TGG	V265I	ATT	I331Q	CAG
L001E	GAG	I067C	TGT	R132S	AGT	G198Y	TAT	V265K	AAG	I331R	CGT
L001F	TTT	I067D	GAT	R132T	ACT	Y199A	GCG	V265L	CTG	I331S	AGT
L001G	GGT	I067E	GAG	R132V	GTG	Y199C	TGT	V265M	ATG	I331T	ACT
L001H	CAT	I067F	TTT	R132Y	TAT	Y199E	GAG	V265N	AAT	I331W	TGG
L001K	AAG	I067G	GGG	S133A	GCT	Y199G	GGG	V265P	CCT	I331Y	TAT
L001N	AAT	I067H	CAT	S133D	GAT	Y199H	CAT	V265Q	CAG	I332A	GCT
L001P	CCG	I067L	TTG	S133E	GAG	Y199I	ATT	V265R	AGG	I332C	TGT
L001Q	CAG	I067N	AAT	S133F	TTT	Y199K	AAG	V265S	TCT	I332D	GAT
L001R	CGG	I067P	CCG	S133G	GGG	Y199L	CTT	V265W	TGG	I332E	GAG
L001S	TCT	I067Q	CAG	S133H	CAT	Y199N	AAT	V265Y	TAT	I332F	TTT
L001T	ACG	I067R	CGG	S133I	ATT	Y199P	CCT	F266A	GCG	I332G	GGT
L001V	GTG	I067T	ACG	S133L	CTG	Y199Q	CAG	F266C	TGT	I332H	CAT
L001W	TGG	I067V	GTT	S133M	ATG	Y199R	AGG	F266D	GAT	I332K	AAG
N002A	GCT	I067W	TGG	S133N	AAT	Y199S	TCG	F266G	GGG	I332L	CTG
N002C	TGT	I067Y	TAT	S133P	CCT	Y199T	ACG	F266H	CAT	I332N	AAT
N002F	TTT	D068A	GCT	S133R	CGG	Y199W	TGG	F266L	CTT	I332P	CCT
N002G	GGG	D068C	TGT	S133T	ACT	N200A	GCT	F266M	CCG	I332R	AGG
N002H	CAT	D068E	GAG	S133V	GTT	N200D	GAT	F266P	ATG	I332S	AGT
N002I	ATT	D068G	GGG	S133W	TGG	N200F	CAG	F266Q	CAG	I332T	ACT
N002K	AAG	D068H	CAC	I134A	GCT	N200G	GGT	F266R	CGG	I332Y	TAT
N002L	TTG	D068I	ATT	I134C	TGT	N200H	CAT	F266S	TCG	N333A	GCT
N002P	CCG	D068K	AAG	I134D	GAT	N200K	AAG	F266T	ACG	N333E	GAG
N002Q	CAG	D068L	TTG	I134F	TTT	N200L	CTG	F266V	GTG	N333G	GGT
N002S	AGT	D068P	CCT	I134G	GGG	N200M	ATG	F266W	TGG	N333H	CAT
N002T	ACG	D068Q	CAG	I134H	CAT	N200P	CCT	F266Y	TAT	N333I	ATT
N002V	GTT	D068R	CGG	I134K	AAG	N200Q	CAG	A267D	GAT	N333K	AAG
N002W	TGG	D068S	TCG	I134L	TTG	N200R	AGG	A267E	GAG	N333L	CTG
N002Y	TAT	D068T	ACT	I134P	CCT	N200S	TCT	A267G	GGT	N333M	ATG
F003A	GCT	D068V	GTG	I134Q	CAG	N200T	ACT	A267H	CAT	N333P	CCT
F003E	GAG	D068Y	TAT	I134R	CGT	N200V	GTG	A267I	ATT	N333R	CGG
F003G	GGG	S069A	GCT	I134S	TCG	N200W	TGG	A267K	AAG	N333S	AGT
F003H	CAT	S069C	TGT	I134T	ACT	N200Y	TAT	A267L	CTT	N333T	ACT
F003I	ATT	S069E	GAG	I134V	GTG	G201A	GCG	A267M	ATG	N333V	GTT
F003K	AAG	S069F	TTT	I134W	TGG	G201E	GAG	A267N	AAT	N333W	TGG
F003L	TTG	S069G	GGG	E135A	GCT	G201F	TTT	A267P	CCG	N333Y	TAT
F003M	ATG	S069I	ATT	E135C	TGT	G201H	CAT	A267R	AGG	V334A	GCT
F003N	AAT	S069L	CTT	E135D	GAT	G201K	AAG	A267S	TCT	V334C	TGT
F003P	CCT	S069M	ATG	E135F	TTT	G201L	CTT	A267T	GTG	V334D	GAT
F003R	CGT	S069N	AAT	E135G	GGG	G201M	ATG	A267V	ACT	V334E	GAG
F003S	TCG	S069P	CCT	E135H	CAT	G201N	AAT	A267W	TGG	V334G	GGG
F003T	ACT	S069R	CGT	E135K	AAG	G201P	CCT	Y268A	GCT	V334H	CAT

mut	cod										
F003V	GTG	S069T	ACG	E135L	TTG	G201Q	CAG	Y268C	TGT	V334L	TTG
F003Y	TAT	S069V	GTT	E135N	AAT	G201R	CGT	Y268F	TTT	V334M	ATG
R004A	GCG	S069W	TGG	E135P	CCT	G201S	TCG	Y268G	GGG	V334N	AAT
R004D	GAT	S069Y	TAT	E135Q	CAG	G201T	ACG	Y268H	CAT	V334P	CCT
R004E	GAG	I070A	GCT	E135R	CGG	G201V	GTG	Y268K	AAG	V334Q	CAG
R004F	TTT	I070C	TGT	E135S	TCT	G201W	TGG	Y268L	CTT	V334R	AGG
R004G	GGG	I070F	TTT	E135W	TGG	S202A	GCG	Y268N	AAT	V334S	TCT
R004I	ATT	I070G	GGG	E135Y	TAT	S202E	GAG	Y268P	CCT	V334T	ACT
R004L	TTG	I070H	CAT	L136A	GCT	S202F	TTT	Y268Q	CAG	V334Y	TAT
R004M	ATG	I070K	AAG	L136C	TGT	S202G	GGT	Y268R	CGT	T335A	GCT
R004N	AAT	I070L	TTG	L136D	GAT	S202H	CAT	Y268S	TCG	T335C	TGT
R004P	CCT	I070N	AAT	L136F	TTT	S202K	AAG	Y268T	ACT	T335F	TTT
R004S	TCT	I070P	CCG	L136G	GGT	S202M	ATG	Y268V	GTG	T335G	GGT
R004T	ACG	I070Q	CAG	L136H	CAT	S202N	AAT	Y268W	TGG	T335H	CAT
R004V	GTG	I070R	CGT	L136I	ATT	S202P	CCT	T269A	GCT	T335I	ATT
R004W	TGG	I070S	TCT	L136M	ATG	S202Q	CAG	T269C	TGT	T335K	AAG
R004Y	TAT	I070T	ACT	L136N	AAT	S202R	CGT	T269D	GAT	T335L	TTG
A005D	GAT	I070V	GTT	L136P	CCT	S202T	ACG	T269E	GAG	T335N	AAT
A005G	GGG	I070Y	TAT	L136Q	CAG	S202V	GTT	T269G	GGT	T335P	CCT
A005H	CAT	T071A	GCT	L136R	CGT	S202W	TGG	T269K	AAG	T335Q	CAG
A005I	ATT	T071C	TGT	L136S	TCG	S202Y	TAT	T269L	CTG	T335S	TCT
A005L	CTT	T071D	GAT	L136T	ACT	C203A	GCG	T269M	ATG	T335V	GTG
A005M	ATG	T071E	GAG	L136W	TGG	C203D	GAT	T269N	AAT	T335W	TGG
A005N	AAT	T071G	GGG	V137A	GCT	C203E	GAG	T269P	CCG	T335Y	TAT
A005P	CCG	T071H	CAT	V137C	TGT	C203G	GGG	T269Q	CAG	L336A	GCT
A005Q	CAG	T071L	TTG	V137E	GAG	C203H	CAT	T269R	AGG	L336E	GAG
A005R	AGG	T071M	ATG	V137F	TTT	C203L	CTT	T269S	TCG	L336F	TTT
A005S	TCG	T071N	AAT	V137G	GGG	C203M	ATG	T269V	GTG	L336G	GGG
A005T	ACG	T071P	CCT	V137H	CAT	C203N	AAT	T269Y	TAT	L336H	CAT
A005V	GTG	T071Q	CAG	V137I	ATT	C203P	CCG	R270A	GCT	L336K	AAG
A005W	TGG	T071R	CGG	V137L	TTG	C203Q	CAG	R270C	TGT	L336M	ATG
A005Y	TAT	T071S	TCG	V137N	AAT	C203R	AGG	R270D	GAT	L336N	AAT
P006A	GCG	T071V	GTG	V137P	CCT	C203S	AGT	R270E	GAG	L336P	CCT
P006D	GAT	T071Y	TAT	V137Q	CAG	C203T	ACT	R270F	TTT	L336R	AGG
P006E	GAG	G072A	GCT	V137R	CGT	C203V	GTG	R270G	GGG	L336S	TCT
P006F	TTT	G072C	TGT	V137S	TCT	C203W	TGG	R270H	CAT	L336T	ACT
P006G	GGG	G072D	GAT	V137T	ACT	F204A	GCG	R270I	ATT	L336V	GTG
P006H	CAT	G072E	GAG	V137W	TGG	F204C	TGT	R270M	ATG	L336W	TGG
P006K	AAG	G072F	TTT	V137Y	TAT	F204E	GAG	R270N	AAT	L336Y	TAT
P006L	CTT	G072H	CAT	Q138A	GCT	F204G	GGG	R270P	CCT	A337C	TGT
P006N	AAT	G072I	ATT	Q138C	TGT	F204H	CAT	R270Q	CAG	A337F	TTT
P006Q	CAG	G072K	AAG	Q138E	GAG	F204I	ATT	R270S	TCG	A337G	GGG
P006R	AGG	G072L	TTG	Q138F	TTT	F204K	AAG	R270T	ACT	A337H	CAT
P006S	AGT	G072M	ATG	Q138G	GGG	F204L	CTT	R270V	GTG	A337I	ATT
P006T	ACG	G072P	CCT	Q138H	CAT	F204M	ATG	R270Y	TAT	A337K	AAG

mut	cod										
P006V	GTG	G072Q	CAG	Q138I	ATT	F204P	CCT	I271A	GCT	A337L	TTG
P006W	TGG	G072R	CGG	Q138L	TTG	F204Q	CAG	I271D	GAT	A337M	ATG
P006Y	TAT	G072S	TCT	Q138M	ATG	F204R	AGG	I271E	GAG	A337N	AAT
P007A	GCT	G072T	ACT	Q138N	AAT	F204S	AGT	I271F	TTT	A337P	CCT
P007C	TGT	G072V	GTG	Q138R	CGT	F204T	ACT	I271G	GGG	A337R	CGG
P007D	GAT	G072W	TGG	Q138S	AGT	F204V	GTG	I271H	CAT	A337S	TCT
P007F	TTT	G072Y	TAT	Q138V	GTT	F204W	TGG	I271K	AAG	A337T	ACT
P007G	GGT	V073A	GCG	Q138W	TGG	N205A	GCG	I271L	CTT	A337V	GTT
P007H	CAT	V073C	TGT	Q138Y	TAT	N205D	GAT	I271M	ATG	A337W	TGG
P007I	ATT	V073D	GAT	Q139A	GCT	N205E	GAG	I271P	CCT	A338C	TGT
P007K	AAG	V073F	TTT	Q139C	TGT	N205F	TTT	I271R	AGG	A338D	GAT
P007L	TTG	V073G	GGG	Q139D	GAT	N205G	GGG	I271S	AGT	A338E	GAG
P007M	ATG	V073H	CAT	Q139E	GAG	N205K	AAG	I271T	ACT	A338F	TTT
P007Q	CAG	V073K	AAG	Q139F	TTT	N205L	CTG	I271V	GTT	A338G	GGG
P007R	CGG	V073L	CTT	Q139G	GGG	N205M	ATG	I271W	TGG	A338H	CAT
P007S	AGT	V073M	ATG	Q139H	CAT	N205P	CCT	V272A	GCT	A338I	ATT
P007T	ACT	V073P	CCG	Q139K	AAG	N205R	AGG	V272C	TGT	A338K	AAG
P007V	GTG	V073Q	CAG	Q139L	CTG	N205S	TCG	V272D	GAT	A338L	CTT
P007W	TGG	V073R	TGG	Q139M	ATG	N205T	ACG	V272E	GAG	A338P	CCT
P007Y	TAT	V073S	TCG	Q139P	CCT	N205V	GTG	V272G	GGG	A338Q	CAG
V008A	GCT	V073T	ACG	Q139R	CGT	N205W	TGG	V272H	CAT	A338R	CGT
V008D	GAT	V073W	CGG	Q139S	TCT	N205Y	TAT	V272K	AAG	A338S	TCG
V008E	GAG	T074A	GCT	Q139T	ACT	V206C	TGT	V272L	TTG	A338T	ACT
V008G	GGT	T074C	TGT	Q139V	GTG	V206D	GAT	V272M	ATG	A338V	GTG
V008H	CAT	T074E	GAG	Q140A	GCT	V206F	TTT	V272N	AAT	K339D	GAT
V008I	ATT	T074F	TTT	Q140C	TGT	V206G	GGG	V272P	CCT	K339E	GAG
V008L	TTG	T074G	GGT	Q140D	GAT	V206H	CAT	V272R	AGG	K339F	TTT
V008M	ATG	T074H	CAT	Q140F	TTT	V206I	ATT	V272S	TCG	K339G	GGG
V008N	AAT	T074K	AAG	Q140G	GGG	V206K	AAG	V272T	ACT	K339H	CAT
V008P	CCT	T074L	TTG	Q140H	CAT	V206L	CTT	V272W	TGG	K339L	CTG
V008Q	CAG	T074M	ATG	Q140I	ATT	V206M	ATG	F273A	GCT	K339M	ATG
V008R	CGG	T074N	AAT	Q140K	AAG	V206P	CCG	F273C	TGT	K339N	AAT
V008S	TCT	T074P	CCG	Q140L	TTG	V206Q	CAG	F273D	GAT	K339P	CCT
V008T	ACT	T074R	CGG	Q140M	ATG	V206R	CGG	F273G	GGG	K339R	CGG
V008W	TGG	T074S	TCG	Q140R	CGG	V206S	TCT	F273H	CAT	K339S	AGT
I009A	GCT	T074V	GTG	Q140S	AGT	V206T	ACG	F273I	ATT	K339T	ACT
I009C	TGT	T074W	TGG	Q140V	GTG	V206Y	TAT	F273L	CTG	K339V	GTT
I009D	GAT	V075A	GCG	Q140W	TGG	E207A	GCT	F273P	CCT	K339W	TGG
I009E	GAG	V075C	TGT	Q140Y	TAT	E207F	TTT	F273Q	CAG	K339Y	TAT
I009G	GGG	V075D	GAT	N141A	GCT	E207G	GGG	F273R	CGG	M340A	GCT
I009H	CAT	V075F	TTT	N141D	GAT	E207H	CAT	F273S	TCG	M340C	TGT
I009K	AAG	V075G	GGG	N141E	GAG	E207I	ATT	F273T	ACG	M340D	GAT
I009L	CTT	V075H	CAT	N141F	TTT	E207K	AAG	F273V	GTT	M340E	GAG
I009N	AAT	V075L	CTT	N141G	GGT	E207L	TTG	F273W	TGG	M340F	TTT
I009P	CCT	V075M	ATG	N141H	CAT	E207M	ATG	F273Y	TAT	M340G	GGG

mut	cod										
I009Q	CAG	V075N	AAT	N141L	TTG	E207P	CCG	T274A	GCG	M340H	CAT
I009R	CGG	V075P	CCG	N141M	ATG	E207Q	CAG	T274C	TGT	M340K	AAG
I009S	AGT	V075Q	CAG	N141P	CCT	E207R	AGG	T274E	GAG	M340L	CTG
I009T	ACG	V075R	CGT	N141Q	CAG	E207S	TCT	T274F	ATG	M340P	CCT
I009V	GTT	V075S	TCT	N141R	CGT	E207T	ACG	T274G	GGG	M340R	CGG
P010D	GAT	V075T	ACT	N141S	TCT	E207V	GTT	T274H	CAT	M340S	TCG
P010E	GAG	V075W	TGG	N141T	ACT	E207W	TGG	T274L	CTG	M340T	ACT
P010F	TTT	V075Y	TAT	N141V	GTT	I208A	GCT	T274N	AAT	M340V	GTG
P010G	GGT	N076A	GCT	N141W	TGG	I208C	TGT	T274P	CCT	M340W	TGG
P010H	CAT	N076C	TGT	N141Y	TAT	I208D	GAT	T274Q	CAG	C341A	GCT
P010I	ATT	N076D	GAT	V142C	TGT	I208E	GAG	T274R	CGT	C341E	GAG
P010L	CTT	N076F	TTT	V142D	GAT	I208G	GGG	T274S	AGT	C341G	GGG
P010M	ATG	N076G	GGG	V142E	GAG	I208K	AAG	T274V	GTT	C341H	CAT
P010N	AAT	N076I	ATT	V142G	GGG	I208L	TTG	T274W	TGG	C341K	AAG
P010Q	CAG	N076K	AAG	V142H	CAT	I208M	ATG	T274Y	TAT	C341L	TTG
P010R	CGG	N076L	CTG	V142I	ATT	I208P	CCG	D275A	GCT	C341M	ATG
P010S	TCG	N076P	CCT	V142K	AAG	I208Q	CAG	D275C	TGT	C341N	AAT
P010T	ACT	N076Q	CAG	V142L	TTG	I208R	CGT	D275E	GAG	C341Q	CAG
P010W	TGG	N076R	CGT	V142M	ATG	I208S	AGT	D275F	TTT	C341R	AGG
P010Y	TAT	N076S	AGT	V142N	AAT	I208T	ACG	D275G	GGG	C341S	TCT
N011A	GCG	N076T	ACT	V142P	CCT	I208V	GTG	D275I	ATT	C341T	ACT
N011C	TGT	N076V	GTT	V142Q	CAG	I208W	TGG	D275K	AAG	C341V	GTT
N011D	GAT	N076W	TGG	V142R	CGG	K209A	GCG	D275L	CTT	C341W	TGG
N011E	GAG	G077D	GAT	V142S	AGT	K209C	TGT	D275M	ATG	C341Y	TAT
N011F	TTT	G077E	GAG	V142T	ACT	K209D	GAT	D275Q	CAG	S342A	GCT
N011G	GGG	G077F	TTT	Q143C	TGT	K209E	GAG	D275R	CGT	S342D	GAT
N011H	CAT	G077H	CAT	Q143E	GAG	K209F	TTT	D275S	TCG	S342E	GAG
N011I	ATT	G077K	AAG	Q143F	TTT	K209G	GGT	D275T	ACT	S342F	TTT
N011K	AAG	G077L	TTG	Q143G	GGG	K209L	CTG	D275V	GTG	S342G	GGG
N011L	CTG	G077M	ATG	Q143H	CAT	K209N	AAT	D275W	TGG	S342H	CAT
N011P	CCG	G077N	AAT	Q143I	ATT	K209P	CCG	Q276C	TGT	S342I	ATT
N011S	TCG	G077P	CCG	Q143K	AAG	K209R	CGG	Q276D	GAT	S342K	AAG
N011T	ACG	G077Q	CAG	Q143L	TTG	K209S	AGT	Q276E	GAG	S342L	TTG
N011W	TGG	G077R	CGT	Q143M	ATG	K209T	ACT	Q276F	TTT	S342M	ATG
N011Y	TAT	G077S	TCG	Q143N	AAT	K209V	GTT	Q276G	GGG	S342P	CCT
V012A	GCT	G077T	ACG	Q143P	CCT	K209W	TGG	Q276H	CAT	S342Q	CAG
V012D	GAT	G077V	GTG	Q143R	CGG	K209Y	TAT	Q276I	ATT	S342R	CGG
V012E	GAG	G077Y	TAT	Q143S	TCG	R210A	GCG	Q276L	CTT	S342T	ACT
V012G	GGG	G078A	GCG	Q143T	ACT	R210C	TGT	Q276M	ATG	S342Y	TAT
V012H	CAT	G078C	TGT	Q143V	GTG	R210D	GAT	Q276P	CCT	Q343C	TGT
V012I	ATT	G078D	GAT	Q143Y	TAT	R210E	GAG	Q276R	CGT	Q343D	GAT
V012K	AAG	G078H	CAT	L144A	GCT	R210G	GGT	Q276S	AGT	Q343E	GAG
V012L	CTT	G078I	ATT	L144E	GAG	R210K	AAG	Q276V	GTT	Q343F	TTT
V012M	ATG	G078K	AAG	L144F	TTT	R210L	CTG	Q276W	TGG	Q343G	GGG
V012N	AAT	G078L	TTG	L144G	GGG	R210M	ATG	Q276Y	TAT	Q343I	ATT

mut	cod										
V012P	CCG	G078M	ATG	L144I	ATT	R210N	AAT	V277A	GCT	Q343L	CTT
V012R	AGG	G078P	CCG	L144K	AAG	R210P	CCT	V277C	TGT	Q343M	ATG
V012S	TCG	G078Q	CAG	L144N	AAT	R210S	TCG	V277D	GAT	Q343P	CCT
V012T	ACT	G078R	AGG	L144P	CCT	R210T	ACT	V277E	GAG	Q343R	AGG
V012W	TGG	G078S	TCG	L144Q	CAG	R210V	GTG	V277G	GGG	Q343S	AGT
P013A	GCT	G078T	ACT	L144R	CGT	R210W	TGG	V277H	CAT	Q343T	ACT
P013E	GAG	G078V	GTG	L144S	TCT	R210Y	TAT	V277K	AAG	Q343V	GTG
P013F	TTT	G078Y	TAT	L144T	ACT	N211A	GCG	V277L	TTG	Q343W	TGG
P013G	GGG	I079A	GCT	L144V	GTT	N211C	TGT	V277M	ATG	Q343Y	TAT
P013H	CAT	I079D	GAT	L144W	TGG	N211F	TTT	V277N	AAT	V344E	GAG
P013I	ATT	I079F	TTT	L144Y	TAT	N211G	GGG	V277Q	CAG	V344F	TTT
P013L	CTT	I079G	GGG	S145A	GCT	N211H	CAT	V277R	AGG	V344G	GGG
P013M	ATG	I079H	CAT	S145C	TGT	N211I	ATT	V277S	TCT	V344H	CAT
P013Q	CAG	I079K	AAG	S145D	GAT	N211K	AAG	V277T	ACT	V344I	ATT
P013R	CGT	I079L	TTG	S145E	GAG	N211L	CTG	V277Y	TAT	V344L	CTG
P013S	TCG	I079N	AAT	S145F	TTT	N211M	ATG	L278A	GCT	V344M	ATG
P013T	ACT	I079P	CCG	S145G	GGG	N211P	CCT	L278E	GAG	V344N	AAT
P013V	GTG	I079R	CGT	S145H	CAT	N211R	CGG	L278F	TTT	V344P	CCT
P013W	TGG	I079S	AGT	S145L	TTG	N211S	AGT	L278G	GGG	V344Q	CAG
P013Y	TAT	I079T	ACT	S145M	ATG	N211T	ACT	L278H	CAT	V344R	CGT
F014A	GCG	I079V	GTT	S145N	AAT	N211V	GTT	L278I	ATT	V344S	TCG
F014D	GAT	I079W	TGG	S145P	CCT	N211W	TGG	L278K	AAG	V344T	ACT
F014E	GAG	I079Y	TAT	S145R	CGT	D212A	GCT	L278M	TTT	V344W	TGG
F014G	GGT	P080A	GCG	S145T	ACT	D212E	GAG	L278N	AAT	V344Y	TAT
F014H	CAT	P080D	GAT	S145V	GTT	D212G	GGG	L278P	CCG	L345A	GCT
F014I	ATT	P080E	GAG	S145W	TGG	D212H	CAT	L278R	CGT	L345C	TGT
F014K	AAG	P080F	TTT	L146A	GCT	D212I	ATT	L278S	TCT	L345D	GAT
F014M	ATG	P080G	GGG	L146C	TGT	D212K	AAG	L278T	ACT	L345E	GAG
F014N	AAT	P080I	ATT	L146E	GAG	D212L	CTG	L278V	GTT	L345G	GGG
F014P	CCT	P080K	AAG	L146G	GGG	D212M	ATG	L278Y	TAT	L345H	CAT
F014Q	CAG	P080L	CTT	L146H	CAT	D212N	AAT	K279A	GCG	L345K	AAG
F014R	CGG	P080M	ATG	L146I	ATT	D212P	CCT	K279C	TGT	L345N	AAT
F014T	ACT	P080N	AAT	L146K	AAG	D212Q	CAG	K279D	GAT	L345P	CCT
F014V	GTG	P080R	AGG	L146N	AAT	D212S	TCG	K279F	TTT	L345Q	CAG
F014W	TGG	P080S	TCT	L146P	CCT	D212T	ACT	K279G	GGG	L345R	CGT
L015A	GCG	P080T	ACG	L146Q	CAG	D212V	GTG	K279H	CAT	L345T	ACT
L015E	GAG	P080V	GTG	L146R	CGG	D212W	TGG	K279L	CTG	L345V	GTT
L015F	TTT	P080Y	TAT	L146S	TCG	D213A	GCT	K279P	CCT	L345W	TGG
L015G	GGG	Q081A	GCT	L146T	ACT	D213E	GAG	K279Q	CAG	L345Y	TAT
L015K	AAG	Q081C	TGT	L146V	GTT	D213G	GGG	K279R	AGG	C346A	GCT
L015M	ATG	Q081E	GAG	L146Y	TAT	D213H	CAT	K279S	TCT	C346D	GAT
L015N	AAT	Q081F	TTT	T147A	GCT	D213K	AAG	K279T	ACG	C346F	TTT
L015P	CCG	Q081G	GGG	T147C	TGT	D213L	CTG	K279V	GTG	C346G	GGG
L015Q	CAG	Q081H	CAT	T147D	GAT	D213M	ATG	K279W	TGG	C346I	ATT
L015R	CGG	Q081L	CTG	T147F	TTT	D213N	AAT	K279Y	TAT	C346K	AAG

mut	cod										
L015S	TCG	Q081M	ATG	T147G	GGT	D213P	CCT	F280D	GAT	C346L	CTT
L015T	ACT	Q081N	AAT	T147I	ATT	D213Q	CAG	F280E	GAG	C346M	ATG
L015V	GTT	Q081P	CCG	T147L	CTT	D213R	CGT	F280G	GGG	C346P	CCT
L015W	TGG	Q081R	AGG	T147M	ATG	D213S	TCG	F280H	CAT	C346Q	CAG
L015Y	TAT	Q081S	TCT	T147P	CCT	D213V	GTG	F280I	ATT	C346R	CGG
W016A	GCG	Q081V	GTT	T147Q	CAG	D213W	TGG	F280L	TTG	C346S	TCT
W016C	TGT	Q081W	TGG	T147R	CGT	D213Y	TAT	F280M	ATG	C346T	ACT
W016D	GAT	Q081Y	TAT	T147S	AGT	L214A	GCG	F280N	AAT	C346V	GTG
W016E	GAG	K082A	GCT	T147V	GTT	L214C	TGT	F280P	CCT	C346W	TGG
W016F	TTT	K082E	GAG	T147W	TGG	L214D	GAT	F280Q	CAG	Q347A	GCT
W016G	GGT	K082G	GGT	T147Y	TAT	L214E	GAG	F280R	CGT	Q347C	TGT
W016H	CAT	K082H	CAT	E148C	TGT	L214G	GGG	F280S	TCG	Q347E	GAG
W016K	AAG	K082I	ATT	E148F	TTT	L214H	CAT	F280T	ACT	Q347F	TTT
W016L	CTT	K082L	CTT	E148G	GGG	L214K	AAG	F280V	GTG	Q347G	GGT
W016M	ATG	K082M	ATG	E148H	CAT	L214N	AAT	F280W	TGG	Q347I	ATT
W016P	CCT	K082N	AAT	E148I	ATT	L214P	CCG	L281A	GCG	Q347L	TTG
W016R	CGT	K082P	CCT	E148K	AAG	L214Q	CAG	L281D	GAT	Q347M	ATG
W016S	TCG	K082Q	CAG	E148L	CTG	L214R	CGG	L281F	TTT	Q347P	CCT
W016T	ACT	K082R	CGT	E148P	CCT	L214S	TCG	L281G	GGT	Q347R	AGG
W016Y	TAT	K082S	AGT	E148Q	CAG	L214T	ACG	L281H	CAT	Q347S	TCT
A017D	GAT	K082T	ACT	E148R	CGG	L214V	GTG	L281I	ATT	Q347T	ACT
A017E	GAG	K082V	GTG	E148S	TCT	L214Y	TAT	L281K	AAG	Q347V	GTG
A017G	GGG	K082W	TGG	E148T	ACT	S215A	GCT	L281N	AAT	Q347W	TGG
A017H	CAT	K082Y	TAT	E148V	GTG	S215C	TGT	L281P	CCG	Q347Y	TAT
A017I	ATT	I083E	GAG	E148W	TGG	S215D	GAT	L281Q	CAG	E348C	TGT
A017L	CTT	I083F	TTT	E148Y	TAT	S215E	GAG	L281R	CGG	E348D	GAT
A017N	AAT	I083G	GGT	A149C	TGT	S215G	GGG	L281S	AGT	E348G	GGT
A017P	CCG	I083H	CAT	A149E	GAG	S215H	CAT	L281V	GTT	E348H	CAT
A017Q	CAG	I083K	AAG	A149F	TTT	S215K	AAG	L281W	TGG	E348I	ATT
A017R	AGG	I083L	CTG	A149G	GGT	S215L	TTG	L281Y	TAT	E348L	TTG
A017S	TCG	I083N	AAT	A149K	AAG	S215M	ATG	S282A	GCG	E348M	ATG
A017T	ACG	I083P	CCT	A149L	TTG	S215P	CCG	S282C	TGT	E348P	CCT
A017V	GTG	I083Q	CAA	A149M	ATG	S215Q	CAG	S282D	GAT	E348Q	CAG
A017W	TGG	I083R	CGT	A149P	CCT	S215R	CGG	S282E	GAG	E348R	CGG
A017Y	TAT	I083S	TCG	A149Q	CAG	S215T	ACT	S282F	TTT	E348S	TCT
W018C	TGT	I083T	ACT	A149R	CGG	S215V	GTG	S282G	GGT	E348T	ACT
W018D	GAT	I083V	GTT	A149S	TCT	S215W	TGG	S282L	CTT	E348V	GTT
W018F	TTT	I083Y	TAT	A149T	ACT	W216D	GAT	S282M	ATG	E348W	TGG
W018G	GGG	S084D	GAT	A149V	GTT	W216E	GAG	S282P	CCT	E348Y	TAT
W018H	CAT	S084E	GAG	A149W	TGG	W216G	GGT	S282Q	CAG	Q349A	GCT
W018I	ATT	S084F	TTT	A149Y	TAT	W216H	CAT	S282R	CGT	Q349D	GAT
W018L	CTG	S084G	GGT	T150A	GCT	W216I	ATT	S282T	ACT	Q349E	GAG
W018M	ATG	S084H	CAT	T150C	TGT	W216K	AAG	S282V	GTT	Q349F	TTT
W018P	CCG	S084I	ATT	T150D	GAT	W216L	CTG	S282W	TGG	Q349G	GGT
W018Q	CAG	S084L	CTT	T150E	GAG	W216M	ATG	S282Y	TAT	Q349H	CAT

mut	cod										
W018R	CGG	S084M	ATG	T150F	TTT	W216N	AAT	Q283A	GCG	Q349K	AAG
W018S	AGT	S084N	AAT	T150G	GGG	W216P	CCT	Q283C	TGT	Q349L	CTG
W018T	ACG	S084P	CCT	T150I	ATT	W216Q	CAG	Q283D	GAT	Q349M	ATG
W018V	GTG	S084Q	CAG	T150L	TTG	W216R	CGG	Q283E	GAG	Q349N	AAT
W018Y	TAT	S084R	CGG	T150N	AAT	W216T	ACG	Q283F	TTT	Q349P	CCT
N019A	GCG	S084T	ACT	T150P	CCT	W216V	GTG	Q283G	GGG	Q349R	CGT
N019C	TGT	S084W	TGG	T150R	AGG	W216Y	TAT	Q283H	CAT	Q349S	TCG
N019F	TTT	S084Y	TAT	T150S	TCT	L217A	GCG	Q283L	CTT	Q349T	ACT
N019G	GGG	L085A	GCT	T150V	GTG	L217C	TGT	Q283N	AAT	Q349V	GTG
N019H	CAT	L085C	TGT	T150W	TGG	L217E	GAG	Q283P	CCG	Q349W	TGG
N019I	ATT	L085D	GAT	T150Y	TAT	L217G	GGT	Q283R	CGT	Q349Y	TAT
N019L	CTG	L085E	GAG	E151A	GCT	L217H	CAT	Q283S	TCT	G350A	GCT
N019M	ATG	L085F	TTT	E151C	TGT	L217I	ATT	Q283T	ACT	G350D	GAT
N019P	CCG	L085G	GGG	E151G	GGT	L217M	ATG	Q283W	TGG	G350E	GAG
N019Q	CAG	L085H	CAT	E151H	CAT	L217P	CCG	Q283Y	TAT	G350F	TTT
N019R	CGT	L085K	AAG	E151K	AAG	L217Q	CAG	D284A	GCT	G350H	CAT
N019S	TCG	L085N	AAT	E151L	TTG	L217R	AGG	D284C	TGT	G350K	AAG
N019V	GTT	L085P	CCT	E151M	ATG	L217S	TCT	D284E	GAG	G350L	CTG
N019W	TGG	L085Q	CAG	E151N	AAT	L217T	ACG	D284G	GGT	G350M	ATG
N019Y	TAT	L085R	CGT	E151Q	CAG	L217V	GTG	D284H	CAT	G350N	AAT
A020D	GAT	L085S	TCG	E151R	AGG	L217W	TGG	D284I	ATT	G350P	CCT
A020E	GAG	L085T	ACT	E151S	TCG	L217Y	TAT	D284L	TTG	G350R	CGT
A020F	TTT	L085V	GTT	E151T	ACT	W218A	GCT	D284M	ATG	G350S	TCT
A020G	GGG	Q086A	GCT	E151V	GTT	W218D	GAT	D284N	AAT	G350T	ACT
A020H	CAT	Q086C	TGT	E151W	TGG	W218F	TTT	D284P	CCG	G350V	GTG
A020K	AAG	Q086D	GAT	E151Y	TAT	W218G	GGT	D284Q	CAG	G350Y	TAT
A020L	CTG	Q086E	GAG	K152A	GCT	W218H	CAT	D284S	TCT	V351A	GCT
A020N	AAT	Q086F	TTT	K152C	TGT	W218I	ATT	D284T	ACG	V351C	TGT
A020P	CCG	Q086G	GGT	K152F	TTT	W218K	AAG	D284V	GTT	V351D	GAT
A020Q	CAG	Q086H	CAT	K152G	GGT	W218L	CTT	D284Y	TAT	V351E	GAG
A020R	CGT	Q086I	ATT	K152I	ATT	W218M	ATG	E285A	GCG	V351F	TTT
A020S	TCT	Q086K	AAG	K152L	TTG	W218P	CCT	E285F	TTT	V351G	GGT
A020T	ACT	Q086L	CTG	K152M	ATG	W218Q	CAG	E285G	GGG	V351H	CAT
A020V	GTT	Q086M	ATG	K152N	AAT	W218R	CGG	E285H	CAT	V351I	ATT
A020Y	TAT	Q086N	AAT	K152P	CCT	W218S	TCG	E285K	AAG	V351L	TTG
P021A	GCG	Q086P	CCT	K152R	AGG	W218T	ACT	E285M	ATG	V351N	AAT
P021C	TGT	Q086R	CGG	K152S	TCT	W218V	GTG	E285N	AAT	V351Q	CAG
P021D	GAT	Q086S	TCT	K152T	ACT	N219A	GCG	E285P	CCT	V351R	AGG
P021E	GAG	Q086T	ACT	K152V	GTG	N219C	TGT	E285Q	CAG	V351S	TCT
P021G	GGG	Q086V	GTG	K152W	TGG	N219D	GAT	E285R	CGT	V351W	TGG
P021H	CAT	Q086W	TGG	K152Y	TAT	N219E	GAG	E285S	AGT	V351Y	TAT
P021I	ATT	D087A	GCT	A153C	TGT	N219G	GGG	E285T	ACG	C352A	GCT
P021K	AAG	D087C	TGT	A153E	GAG	N219H	CAT	E285V	GTG	C352D	GAT
P021L	CTT	D087E	GAG	A153F	TTT	N219I	ATT	E285W	TGG	C352E	GAG
P021M	ATG	D087G	GGG	A153G	GGT	N219K	AAG	E285Y	TAT	C352F	TTT

mut	cod										
P021R	CGT	D087H	CAT	A153H	CAT	N219L	CTT	L286A	GCG	C352G	GGG
P021S	TCT	D087I	ATT	A153I	ATT	N219M	ATG	L286C	TGT	C352K	AAG
P021T	ACG	D087L	CTG	A153K	AAG	N219P	CCT	L286D	GAT	C352M	ATG
P021V	GTT	D087M	ATG	A153L	CTG	N219R	CGT	L286E	GAG	C352P	CCT
P021W	TGG	D087P	CCT	A153M	ATG	N219S	TCG	L286F	TTT	C352Q	CAG
S022A	GCT	D087Q	CAG	A153P	CCT	N219T	ACT	L286G	GGT	C352R	CGT
S022C	TGT	D087R	AGG	A153Q	CAG	N219W	TGG	L286H	CAT	C352S	AGT
S022D	GAT	D087S	TCG	A153R	CGT	E220A	GCG	L286K	AAG	C352T	ACT
S022E	GAG	D087T	ACT	A153S	AGT	E220D	GAT	L286M	ATG	C352V	GTG
S022G	GGG	D087V	GTT	A153T	ACT	E220G	GGG	L286P	CCT	C352W	TGG
S022H	CAT	D087Y	TAT	A153V	GTG	E220H	CAT	L286R	AGG	C352Y	TAT
S022K	AAG	H088A	GCT	A153W	TGG	E220I	ATT	L286S	AGT	I353A	GCT
S022L	CTG	H088C	TGT	K154A	GCT	E220K	AAG	L286T	ACG	I353C	TGT
S022M	ATG	H088E	GAG	K154C	TGT	E220L	TTG	L286W	TGG	I353E	GAG
S022N	AAT	H088F	TTT	K154D	GAT	E220M	ATG	L286Y	TAT	I353F	TTT
S022P	CCG	H088G	GGG	K154E	GAG	E220N	AAT	V287A	GCT	I353G	GGG
S022R	CGG	H088I	ATT	K154G	GGT	E220P	CCG	V287C	TGT	I353H	CAT
S022T	ACT	H088K	AAG	K154H	CAT	E220R	CGG	V287D	GAT	I353K	AAG
S022V	GTG	H088L	TTG	K154I	ATT	E220S	TCT	V287E	GAG	I353L	CTT
S022Y	TAT	H088M	ATG	K154L	CTG	E220T	ACG	V287F	TTT	I353M	ATG
E023A	GCT	H088P	CCT	K154P	CCT	E220V	GTG	V287G	GGG	I353Q	CAG
E023D	GAT	H088R	CGT	K154R	CGG	E220W	TGG	V287I	ATT	I353R	CGT
E023F	TTT	H088S	AGT	K154S	AGT	S221A	GCG	V287K	AAG	I353S	TCG
E023G	GGG	H088T	ACT	K154T	ACT	S221C	TGT	V287L	CTT	I353T	ACT
E023H	CAT	H088V	GTT	K154V	GTG	S221D	GAT	V287N	AAT	I353V	GTG
E023L	CTT	H088Y	TAT	K154W	TGG	S221E	GAG	V287P	CCT	I353W	TGG
E023M	ATG	L089A	GCT	K154Y	TAT	S221G	GGG	V287Q	CAG	R354C	TGT
E023N	AAT	L089C	TGT	Q155A	GCT	S221H	CAT	V287R	CGG	R354D	GAT
E023P	CCT	L089D	GAT	Q155C	TGT	S221I	ATT	V287S	TCT	R354E	GAG
E023Q	CAG	L089E	GAG	Q155D	GAT	S221K	AAG	V287T	ACT	R354G	GGT
E023R	CGG	L089G	GGG	Q155F	TTT	S221L	TTG	Y288D	GAC	R354H	CAT
E023S	TCT	L089K	AAG	Q155G	GGG	S221M	ATG	Y288E	GAG	R354I	ATT
E023T	ACG	L089M	ATG	Q155H	CAT	S221P	CCG	Y288F	TTT	R354K	AAG
E023V	GTG	L089N	AAT	Q155K	AAG	S221Q	CAG	Y288G	GGG	R354L	CTT
E023W	TGG	L089P	CCT	Q155L	CTT	S221R	CGG	Y288H	CAT	R354M	ATG
F024A	GCG	L089Q	CAG	Q155M	ATG	S221T	ACT	Y288I	ATT	R354P	CCT
F024C	TGT	L089R	AGG	Q155P	CCT	S221V	GTG	Y288K	AAG	R354Q	CAG
F024E	GAG	L089S	TCG	Q155R	CGG	T222A	GCG	Y288L	CTG	R354S	TCT
F024G	GGG	L089T	ACT	Q155S	AGT	T222D	GAT	Y288P	CCT	R354V	GTG
F024H	CAT	L089W	TGG	Q155T	ACT	T222E	GAG	Y288Q	CAG	R354W	TGG
F024I	ATT	L089Y	TAT	Q155V	GTT	T222F	TTT	Y288R	CGT	R354Y	TAT
F024K	AAG	D090A	GCT	Q155W	TGG	T222G	GGG	Y288S	TCT	K355D	GAT
F024L	TTG	D090C	TGT	Q155Y	TAT	T222I	ATT	Y288T	ACT	K355F	TTT
F024M	ATG	D090E	GAG	E156A	GCT	T222K	AAA	Y288V	GTG	K355G	GGG
F024N	AAT	D090G	GGG	E156C	TGT	T222L	TTG	Y288W	TGG	K355H	CAT

mut	cod										
F024P	CCT	D090H	CAT	E156D	GAT	T222N	AAT	T289A	GCT	K355L	CTG
F024R	CGT	D090I	ATT	E156G	GGT	T222P	CCG	T289C	TGT	K355M	ATG
F024T	ACG	D090K	AAG	E156I	ATT	T222R	CGG	T289E	GAG	K355N	AAT
F024V	GTT	D090L	CTT	E156K	AAG	T222S	AGT	T289G	GGT	K355P	CCT
F024Y	TAT	D090N	AAT	E156L	CTG	T222V	GTT	T289H	CAT	K355Q	CAG
C025D	GAT	D090P	CCT	E156M	ATG	T222W	TGG	T289K	AAG	K355R	CGT
C025E	GAG	D090Q	CAG	E156P	CCT	T222Y	TAT	T289L	CTT	K355S	TCT
C025F	TTT	D090R	AGG	E156Q	CAG	A223C	TGT	T289M	ATG	K355T	ACT
C025G	GGG	D090S	AGT	E156R	CGG	A223D	GAT	T289N	AAT	K355V	GTG
C025H	CAT	D090T	ACT	E156S	TCT	A223E	GAG	T289P	CCT	K355W	TGG
C025I	ATT	D090W	TGG	E156T	ACT	A223G	GGG	T289Q	CAG	K355Y	TAT
C025K	AAG	K091A	GCT	E156V	GTT	A223H	CAT	T289R	AGG	N356A	GCT
C025L	TTG	K091D	GAT	E156W	TGG	A223K	AAG	T289S	TCG	N356C	TGT
C025N	AAT	K091E	GAG	F157A	GCT	A223L	CTG	T289V	GTG	N356D	GAT
C025P	CCT	K091F	TTT	F157C	TGT	A223P	CCT	T289Y	TAT	N356F	TTT
C025R	CGT	K091G	GGG	F157D	GAT	A223Q	CAG	F290A	GCT	N356G	GGG
C025S	TCT	K091H	CAT	F157E	GAG	A223R	AGG	F290C	TGT	N356H	CAT
C025T	ACT	K091I	ATT	F157G	GGT	A223S	TCT	F290D	GAT	N356K	AAG
C025V	GTG	K091L	TTG	F157H	CAT	A223T	ACG	F290G	GGG	N356L	CTG
C025Y	TAT	K091N	AAT	F157I	ATT	A223V	GTG	F290H	CAT	N356P	CCT
L026A	GCT	K091Q	CAG	F157K	AAG	A223W	TGG	F290I	ATT	N356Q	CAG
L026E	GAG	K091R	CGT	F157L	TTG	A223Y	TAT	F290K	AAG	N356R	CGG
L026G	GGT	K091S	TCT	F157M	ATG	L224A	GCT	F290L	TTG	N356S	AGT
L026H	CAT	K091T	ACT	F157P	CCT	L224D	GAT	F290M	ATG	N356T	ACT
L026I	ATT	K091Y	TAT	F157Q	CAG	L224E	GAG	F290Q	CAG	N356V	GTG
L026K	AAG	A092C	TGT	F157R	CGG	L224F	TTT	F290R	AGG	N356W	TGG
L026M	ATG	A092E	GAG	F157S	TCG	L224G	GGG	F290S	TCG	W357A	GCT
L026P	CCG	A092F	TTT	F157T	ACT	L224I	ATT	F290T	ACT	W357C	TGT
L026Q	CAG	A092G	GGT	F157V	GTG	L224M	ATG	F290V	GTT	W357D	GAT
L026R	CGG	A092H	CAT	F157W	TGG	L224P	CCG	F290Y	TAT	W357E	GAG
L026S	TCT	A092K	AAG	E158A	GCT	L224Q	CAG	G291A	GCT	W357F	TTT
L026T	ACT	A092L	CTG	E158C	TGT	L224R	AGG	G291C	TGT	W357G	GGG
L026V	GTT	A092M	ATG	E158D	GAT	L224S	AGT	G291D	GAT	W357K	AAG
L026W	TGG	A092P	CCT	E158F	TTT	L224T	ACT	G291E	GAG	W357L	TTG
L026Y	TAT	A092Q	CAG	E158G	GGG	L224V	GTT	G291F	TTT	W357M	ATG
G027A	GCT	A092R	CGT	E158H	CAT	L224W	TGG	G291H	CAT	W357P	CCT
G027C	TGT	A092T	ACT	E158K	AAG	L224Y	TAT	G291I	CTG	W357Q	CAG
G027D	GAT	A092V	GTT	E158L	CTG	Y225A	GCG	G291M	ATG	W357R	CGT
G027E	GAG	A092W	TGG	E158N	AAT	Y225D	GAT	G291N	AAT	W357S	AGT
G027F	TTT	A092Y	TAT	E158P	CCT	Y225E	GAG	G291P	CCT	W357T	ACT
G027H	CAT	K093D	GAT	E158Q	CAG	Y225G	GGT	G291Q	CAG	W357V	GTG
G027I	ATT	K093E	GAG	E158R	CGG	Y225H	CAT	G291R	CGG	N358C	TGT
G027K	AAG	K093F	TTT	E158S	TCG	Y225K	AAG	G291S	TCT	N358D	GAT
G027L	CTG	K093G	GGT	E158V	GTG	Y225L	CTG	G291T	ACT	N358E	GAG
G027P	CCT	K093H	CAT	E158Y	TAT	Y225P	CCG	G291V	GTG	N358G	GGG

mut	cod										
G027Q	CAG	K093I	ATT	K159A	GCT	Y225Q	CAG	G291W	TGG	N358H	CAT
G027R	CGG	K093L	CTG	K159D	GAT	Y225R	AGG	G291Y	TAT	N358I	ATT
G027S	TCG	K093M	ATG	K159E	GAG	Y225S	TCT	E292A	GCT	N358K	AAG
G027T	ACT	K093N	AAT	K159F	TTT	Y225T	ACG	E292C	TGT	N358L	CTG
G027W	TGG	K093P	CCT	K159G	GGT	Y225V	GTG	E292F	TTT	N358P	CCT
K028A	GCG	K093Q	CAG	K159H	CAT	Y225W	TGG	E292G	GGT	N358Q	CAG
K028D	GAT	K093R	CGG	K159L	CTT	P226A	GCG	E292H	CAT	N358R	CGT
K028E	GAG	K093S	AGT	K159M	ATG	P226C	TGT	E292I	ATT	N358S	TCT
K028F	TTT	K093T	ACT	K159N	AAT	P226D	GAT	E292K	AAG	N358T	ACT
K028G	GGG	K093V	GTT	K159Q	CAG	P226E	GAG	E292L	TTG	N358V	GTG
K028I	ATT	K094A	GCT	K159R	CGG	P226F	TTT	E292N	AAT	N358W	TGG
K028L	TTG	K094C	TGT	K159S	TCT	P226G	GGT	E292P	CCT	S359A	GCT
K028M	ATG	K094D	GAT	K159V	GTG	P226L	CTT	E292Q	CAG	S359C	TGT
K028N	AAT	K094E	GAG	K159W	TGG	P226N	AAT	E292R	CGG	S359D	GAT
K028P	CCT	K094F	TTT	K159Y	TAT	P226Q	CAG	E292T	ACT	S359E	GAG
K028R	CGG	K094G	GGG	A160C	TGT	P226R	AGG	E292V	GTT	S359F	TTT
K028S	AGT	K094H	CAT	A160F	TTT	P226S	TCT	E292W	TGG	S359G	GGG
K028T	ACT	K094L	TTG	A160G	GGG	P226T	ACG	T293A	GCT	S359H	CAT
K028V	GTT	K094M	ATG	A160H	CAT	P226V	GTT	T293C	TGT	S359K	AAG
K028W	TGG	K094N	AAT	A160I	ATT	P226W	TGG	T293D	GAT	S359L	TTG
F029A	GCT	K094P	CCT	A160K	AAG	P226Y	TAT	T293E	GAG	S359M	ATG
F029C	TGT	K094Q	CAG	A160L	CTG	S227A	GCT	T293F	TTT	S359P	CCT
F029E	GAG	K094R	AGG	A160M	ATG	S227F	TTT	T293G	GGT	S359R	CGG
F029G	GGG	K094S	TCT	A160N	AAT	S227G	GGG	T293K	AAG	S359T	ACT
F029H	CAT	K094T	ACT	A160Q	CAG	S227H	CAT	T293L	CTT	S359V	GTT
F029I	ATT	D095A	GCT	A160R	AGG	S227I	ATT	T293M	ATG	S359W	TGG
F029K	AAG	D095C	TGT	A160S	AGT	S227K	AAG	T293N	AAT	S360A	GCT
F029L	CTT	D095E	GAG	A160V	GTG	S227L	TTG	T293P	CCT	S360C	TGT
F029M	ATG	D095F	TTT	A160W	TGG	S227M	ATG	T293Q	CAG	S360E	GAG
F029P	CCG	D095G	GGG	A160Y	TAT	S227P	CCT	T293S	TCT	S360F	TTT
F029R	CGG	D095H	CAT	G161A	GCT	S227Q	CAG	T293V	GTG	S360G	GGG
F029S	TCG	D095K	AAG	G161C	TGT	S227R	CGG	T293Y	TAT	S360I	ATT
F029T	ACG	D095L	TTG	G161D	GAT	S227T	ACG	V294A	GCT	S360K	AAG
F029V	GTG	D095M	ATG	G161E	GAG	S227V	GTG	V294C	TGT	S360L	CTG
F029W	TGG	D095P	CCT	G161H	CAT	S227W	TGG	V294E	GAG	S360M	ATG
D030A	GCG	D095Q	CAG	G161I	ATT	S227Y	TAT	V294G	GGG	S360N	AAT
D030E	GAG	D095S	TCT	G161K	AAG	I228A	GCG	V294H	CAT	S360P	CCT
D030F	TTT	D095V	GTG	G161L	CTT	I228E	GAG	V294K	AAG	S360Q	CAG
D030G	GGG	D095W	TGG	G161M	ATG	I228F	TTT	V294L	TTG	S360R	AGG
D030H	CAT	D095Y	TAT	G161Q	CAG	I228G	GGG	V294M	ATG	S360T	ACT
D030K	AAG	I096A	GCT	G161R	CGT	I228H	CAT	V294N	AAT	S360V	GTT
D030L	TTG	I096C	TGT	G161S	AGT	I228K	AAG	V294P	CCT	D361A	GCT
D030M	ATG	I096D	GAT	G161T	ACT	I228L	TTG	V294Q	CAG	D361C	TGT
D030P	CCT	I096E	GAG	G161V	GTG	I228M	ATG	V294R	AGG	D361E	GAG
D030Q	CAG	I096F	TTT	G161W	TGG	I228N	AAT	V294S	AGT	D361G	GGG

mut	cod										
D030R	CGG	I096G	GGG	K162A	GCT	I228P	CCG	V294T	ACT	D361H	CAT
D030S	TCG	I096H	CAT	K162D	GAT	I228Q	CAG	V294W	TGG	D361L	TTG
D030T	ACT	I096L	TTG	K162E	GAG	I228R	CGT	A295C	TGT	D361M	ATG
D030V	GTT	I096N	AAT	K162F	TTT	I228S	TCT	A295D	GAT	D361N	AAT
D030W	TGG	I096P	CCT	K162G	GGG	I228T	ACT	A295E	GAG	D361P	CCT
E031A	GCG	I096R	CGT	K162H	CAT	I228W	TGG	A295F	TTT	D361Q	CAG
E031C	TGT	I096S	AGT	K162L	TTG	Y229E	GAG	A295G	GGG	D361R	AGG
E031G	GGG	I096T	ACT	K162M	ATG	Y229F	TTT	A295H	CAT	D361S	TCG
E031H	CAT	I096V	GTG	K162P	CCT	Y229G	GGT	A295I	ATT	D361V	GTT
E031I	ATT	I096W	TGG	K162Q	CAG	Y229H	CAT	A295L	CTG	D361W	TGG
E031K	AAG	T097A	GCT	K162R	CGG	Y229I	ATT	A295N	AAT	D361Y	TAT
E031L	CTG	T097C	TGT	K162S	TCG	Y229K	AAG	A295P	CCT	Y362A	GCT
E031N	AAC	T097D	GAT	K162V	GTG	Y229L	TTG	A295Q	CAG	Y362C	TGT
E031P	CCG	T097E	GAG	K162W	TGG	Y229N	AAT	A295S	AGT	Y362E	GAG
E031R	CGG	T097F	TTT	K162Y	TAT	Y229P	CCT	A295T	ACT	Y362G	GGG
E031S	TCT	T097G	GGG	D163A	GCT	Y229Q	CAG	A295V	GTT	Y362H	CAT
E031T	ACG	T097I	ATT	D163C	TGT	Y229R	CGT	A295Y	TAT	Y362K	AAG
E031V	GTG	T097L	CTT	D163E	GAG	Y229S	TCG	L296A	GCT	Y362L	CTT
E031W	TGG	T097N	AAT	D163F	TTT	Y229T	ACT	L296C	TGT	Y362M	ATG
E031Y	TAT	T097P	CCT	D163G	GGG	Y229V	GTG	L296F	TTT	Y362N	AAT
P032A	GCG	T097Q	CAG	D163H	CAC	Y229W	TGG	L296G	GGT	Y362P	CCT
P032C	TGT	T097R	CGG	D163K	AAG	L230A	GCG	L296I	ATT	Y362R	CGG
P032F	TTT	T097S	TCG	D163L	CTT	L230E	GAG	L296K	AAG	Y362S	AGT
P032G	GGG	T097W	TGG	D163P	CCT	L230G	GGG	L296M	ATG	Y362T	ACT
P032H	CAT	T097Y	TAT	D163Q	CAG	L230H	CAT	L296P	CCT	Y362V	GTG
P032K	AAG	F098A	GCT	D163R	AGG	L230I	ATT	L296Q	CAG	Y362W	TGG
P032L	CTG	F098C	TGT	D163S	TCG	L230K	AAG	L296R	CGT	L363A	GCT
P032M	ATG	F098D	GAT	D163T	ACT	L230M	ATG	L296S	TCG	L363C	TGT
P032N	AAT	F098E	GAG	D163V	GTG	L230N	AAT	L296T	ACT	L363D	GAT
P032Q	CAG	F098G	GGG	D163W	TGG	L230P	CCT	L296V	GTT	L363E	GAG
P032R	CGG	F098H	CAT	F164A	GCT	L230R	CGT	L296W	TGG	L363F	TTT
P032S	TCG	F098I	ATT	F164C	TGT	L230S	AGT	L296Y	TAT	L363G	GGG
P032T	ACT	F098L	TTG	F164D	GAT	L230T	ACT	G297A	GCT	L363H	CAT
P032V	GTG	F098M	ATG	F164E	GAG	L230V	GTT	G297C	TGT	L363I	ATT
P032W	TGG	F098P	CCT	F164G	GGG	L230W	TGG	G297E	GAG	L363P	CCT
P032Y	TAT	F098Q	CAG	F164H	CAT	L230Y	TAT	G297H	CAT	L363Q	CAG
L033C	TGT	F098R	CGT	F164L	TTG	N231A	GCT	G297I	ATT	L363R	CGG
L033D	GAT	F098S	TCG	F164M	ATG	N231C	TGT	G297L	CTT	L363S	TCG
L033G	GGG	F098V	GTT	F164N	AAT	N231D	GAT	G297N	AAT	L363T	ACT
L033H	CAT	F098W	TGG	F164P	CCT	N231F	TTT	G297P	CCT	L363V	GTG
L033I	ATT	Y099A	GCT	F164Q	CAG	N231G	GGG	G297Q	CAG	L363W	TGG
L033M	ATG	Y099C	TGT	F164R	CGG	N231H	CAT	G297R	CGG	H364A	GCT
L033N	AAT	Y099E	GAG	F164S	AGT	N231I	ATT	G297S	AGT	H364C	TGT
L033P	CCG	Y099F	TTT	F164V	GTT	N231K	AAG	G297T	ACT	H364D	GAT
L033Q	CAG	Y099G	GGT	F164W	TGG	N231L	CTT	G297V	GTG	H364E	GAG

mut	cod										
L033R	AGG	Y099I	ATT	L165A	GCT	N231P	CCT	G297W	TGG	H364F	TTT
L033S	TCG	Y099L	TTG	L165C	TGT	N231Q	CAG	G297Y	TAT	H364G	GGG
L033T	ACT	Y099N	AAT	L165D	GAT	N231R	CGT	A298C	TGT	H364K	AAG
L033V	GTT	Y099P	CCT	L165F	TTT	N231S	TCT	A298E	GAG	H364L	CTG
L033W	TGG	Y099Q	CAG	L165G	GGG	N231T	ACG	A298G	GGG	H364M	ATG
L033Y	TAT	Y099R	AGG	L165H	CAT	N231V	GTG	A298I	ATT	H364P	CCT
D034A	GCT	Y099S	TCG	L165N	AAT	T232A	GCG	A298L	TTG	H364R	CGG
D034E	GAG	Y099T	ACT	L165P	CCT	T232C	TGT	A298M	ATG	H364S	TCT
D034G	GGT	Y099V	GTT	L165Q	CAG	T232F	TTT	A298N	AAT	H364T	ACT
D034H	CAT	Y099W	TGG	L165R	CGG	T232G	GGG	A298P	CCT	H364V	GTG
D034I	ATT	M100C	TGT	L165S	TCG	T232H	CAT	A298Q	CAG	H364Y	TAT
D034K	AAG	M100E	GAG	L165T	ACT	T232K	AAG	A298R	CGT	L365A	GCT
D034L	CTT	M100F	TTT	L165V	GTG	T232L	CTT	A298S	TCG	L365C	TGT
D034N	AAT	M100G	GGT	L165W	TGG	T232M	ATG	A298T	ACT	L365D	GAT
D034P	CCT	M100K	AAG	L165Y	TAT	T232N	AAT	A298V	GTG	L365E	GAG
D034Q	CAG	M100L	CTG	V166A	GCT	T232P	CCG	A298W	TGG	L365G	GGG
D034R	CGT	M100N	AAT	V166C	TGT	T232Q	CAG	A298Y	TAT	L365I	ATT
D034S	AGT	M100P	CCT	V166D	GAT	T232R	AGG	S299A	GCT	L365M	ATG
D034T	ACG	M100Q	CAG	V166E	GAG	T232S	AGT	S299C	TGT	L365N	AAT
D034V	GTT	M100R	CGG	V166F	TTT	T232V	GTG	S299D	GAT	L365P	CCT
D034W	TGG	M100S	TCT	V166G	GGT	T232Y	TAT	S299E	GAG	L365Q	CAG
M035A	GCG	M100T	ACT	V166H	CAT	Q233A	GCG	S299F	TTT	L365R	CGG
M035D	GAT	M100V	GTT	V166L	CTT	Q233C	TGT	S299G	GGG	L365S	AGT
M035F	TTT	M100W	TGG	V166N	AAT	Q233D	GAT	S299H	CAT	L365T	ACT
M035G	GGG	M100Y	TAT	V166P	CCT	Q233F	TTT	S299I	ATT	L365V	GTG
M035H	CAT	P101A	GCT	V166Q	CAG	Q233G	GGG	S299L	CTT	L365W	TGG
M035I	ATT	P101C	TGT	V166R	CGG	Q233I	ATT	S299M	ATG	L365Y	TAT
M035L	TTG	P101F	TTT	V166T	ACT	Q233K	AAG	S299P	CCT	N366A	GCT
M035N	AAT	P101G	GGG	V166W	TGG	Q233L	CTG	S299Q	CAG	N366C	TGT
M035P	CCG	P101H	CAT	V166Y	TAT	Q233P	CCG	S299R	AGG	N366E	GAG
M035Q	CAG	P101I	ATT	E167A	GCT	Q233R	AGG	S299T	ACT	N366F	TTT
M035R	CGT	P101K	AAG	E167D	GAT	Q233S	TCG	S299Y	TAT	N366G	GGG
M035S	TCT	P101L	CTT	E167F	TTT	Q233T	ACG	G300A	GCT	N366K	AAG
M035T	ACT	P101M	ATG	E167G	GGT	Q233V	GTG	G300C	TGT	N366L	TTG
M035V	GTT	P101N	AAT	E167H	CAT	Q233W	TGG	G300D	GAT	N366M	ATG
M035Y	TAT	P101Q	CAG	E167K	AAG	Q233Y	TAT	G300E	GAG	N366P	CCT
S036A	GCG	P101R	AGG	E167L	TTG	Q234A	GCT	G300F	TTT	N366Q	CAG
S036C	TGT	P101S	TCT	E167M	ATG	Q234C	TGT	G300L	CTT	N366R	AGG
S036D	GAT	P101T	ACT	E167N	AAT	Q234D	GAT	G300M	ATG	N366S	TCT
S036F	TTT	P101Y	TAT	E167P	CCT	Q234E	GAG	G300N	AAT	N366T	ACT
S036G	GGT	V102A	GCT	E167R	AGG	Q234G	GGT	G300P	CCT	N366V	GTT
S036H	CAT	V102C	TGT	E167S	TCG	Q234H	CAT	G300Q	CAG	N366W	TGG
S036K	AAG	V102E	GAG	E167T	ACT	Q234L	CTT	G300R	AGG	P367A	GCT
S036L	TTG	V102G	GGT	E167V	GTT	Q234M	ATG	G300S	TCG	P367C	TGT
S036N	AAT	V102H	CAT	E167Y	TAT	Q234N	AAT	G300T	ACT	P367E	GAG

mut	cod										
S036P	CCG	V102K	AAG	T168A	GCT	Q234P	CCG	G300V	GTT	P367F	TTT
S036R	CGG	V102L	TTG	T168C	TGT	Q234R	CGG	G300W	TGG	P367G	GGT
S036T	ACG	V102M	ATG	T168D	GAT	Q234S	AGT	I301A	GCT	P367H	CAT
S036V	GTT	V102N	AAT	T168E	GAG	Q234T	ACT	I301E	GAG	P367I	ATT
S036W	TGG	V102P	CCT	T168F	TTT	Q234V	GTG	I301G	GGG	P367K	AAG
S036Y	TAT	V102Q	CAG	T168G	GGG	Q234W	TGG	I301H	CAT	P367L	CTG
L037A	GCG	V102R	AGG	T168H	CAT	S235A	GCG	I301K	AAG	P367M	ATG
L037C	TGT	V102S	TCT	T168K	AAG	S235E	GAG	I301L	CTG	P367Q	CAG
L037E	GAG	V102T	ACT	T168L	CTG	S235F	TTT	I301M	ATG	P367R	CGT
L037F	TTT	V102W	TGG	T168P	CCT	S235G	GGG	I301N	AAT	P367S	TCG
L037G	GGG	D103A	GCT	T168R	CGG	S235H	CAT	I301P	CCT	P367V	GTT
L037I	ATT	D103E	GAG	T168S	TCT	S235K	AAG	I301Q	CAG	P367W	TGG
L037K	AAG	D103F	TTT	T168V	GTG	S235L	CTT	I301R	CGG	D368A	GCT
L037M	ATG	D103G	GGG	T168W	TGG	S235M	ATG	I301S	AGT	D368C	TGT
L037N	AAT	D103H	CAT	T168Y	TAT	S235P	CCT	I301V	GTT	D368E	GAG
L037P	CCT	D103I	ATT	I169A	GCT	S235Q	CAG	I301W	TGG	D368G	GGT
L037R	AGG	D103L	CTT	I169D	GAT	S235R	CGG	I301Y	TAT	D368H	CAT
L037S	TCT	D103N	AAT	I169F	TTT	S235T	ACG	V302C	TGT	D368K	AAG
L037T	ACG	D103Q	CAG	I169G	GGG	S235V	GTG	V302D	GAT	D368L	CTT
L037V	GTG	D103R	AGG	I169H	CAT	S235W	TGG	V302E	GAG	D368M	ATG
L037W	TGG	D103S	TCG	I169K	AAG	S235Y	TAT	V302F	TTT	D368P	CCT
F038A	GCG	D103T	ACT	I169L	TTG	P236A	GCT	V302G	GGT	D368R	CGT
F038C	TGT	D103V	GTT	I169N	AAT	P236C	TGT	V302H	CAT	D368S	AGT
F038E	GAG	D103W	TGG	I169P	CCT	P236E	GAG	V302I	ATT	D368T	ACT
F038G	GGG	D103Y	TAT	I169Q	CAG	P236G	GGG	V302L	TTG	D368V	GTT
F038K	AAG	N104A	GCT	I169R	CGG	P236H	CAT	V302M	ATG	D368W	TGG
F038L	CTT	N104C	TGT	I169S	TCG	P236I	ATT	V302P	CCT	D368Y	TAT
F038M	ATG	N104F	TTT	I169T	ACT	P236K	AAG	V302R	AGG	N369A	GCT
F038N	AAT	N104G	GGG	I169V	GTT	P236L	CTG	V302S	TCG	N369C	TGT
F038P	CCT	N104H	CAT	I169Y	TAT	P236N	AAT	V302T	ACT	N369E	GAG
F038Q	CAG	N104I	ATT	K170A	GCT	P236Q	CAG	V302W	TGG	N369F	TTT
F038R	AGG	N104K	AAG	K170C	TGT	P236R	CGT	V302Y	TAT	N369H	CAT
F038S	TCT	N104L	CTG	K170D	GAT	P236S	AGT	I303A	GCT	N369I	ATT
F038T	ACT	N104M	ATG	K170E	GAG	P236T	ACT	I303C	TGT	N369K	AAG
F038W	TGG	N104P	CCT	K170G	GGG	P236W	TGG	I303D	GAT	N369L	CTT
F038Y	TAT	N104R	AGG	K170I	ATT	P236Y	TAT	I303E	GAG	N369P	CCT
S039A	GCG	N104S	TCT	K170L	TTG	V237A	GCG	I303F	TTT	N369Q	CAG
S039C	TGT	N104T	ACT	K170M	ATG	V237C	TGT	I303G	GGT	N369R	CGG
S039D	GAT	N104V	GTT	K170N	AAT	V237E	GAG	I303K	AAG	N369S	TCG
S039F	TTT	N104W	TGG	K170P	CCT	V237F	TTT	I303L	TTG	N369T	ACT
S039G	GGT	L105A	GCT	K170Q	CAG	V237G	GGT	I303M	ATG	N369V	GTG
S039L	TTG	L105C	TGT	K170R	CGT	V237H	CAT	I303P	CCT	N369W	TGG
S039M	ATG	L105D	GAT	K170V	GTT	V237L	TTG	I303R	CGT	F370A	GCT
S039N	AAT	L105E	GAG	K170W	TGG	V237N	AAT	I303S	AGT	F370D	GAT
S039P	CCG	L105G	GGT	K170Y	TAT	V237P	CCT	I303V	GTG	F370E	GAG

mut	cod										
S039Q	CAG	L105H	CAT	L171A	GCT	V237Q	CAG	I303W	TGG	F370G	GGG
S039R	CGT	L105I	ATT	L171C	TGT	V237R	CGG	I303Y	TAT	F370H	CAT
S039T	ACT	L105M	ATG	L171D	GAT	V237S	TCG	W304A	GCT	F370I	ATT
S039V	GTT	L105N	AAT	L171G	GGG	V237T	ACG	W304C	TGT	F370K	AAG
S039W	TGG	L105P	CCT	L171H	CAT	V237W	TGG	W304D	GAT	F370L	CTG
S039Y	TAT	L105Q	CAG	L171I	ATT	V237Y	TAT	W304G	GGT	F370N	AAT
F040A	GCG	L105R	CGG	L171M	ATG	A238D	GAT	W304I	ATT	F370P	CCT
F040D	GAT	L105S	TCT	L171N	AAT	A238E	GAG	W304L	CTG	F370Q	CAG
F040E	GAG	L105T	ACT	L171P	CCT	A238F	TTT	W304M	ATG	F370R	AGG
F040G	GGT	L105V	GTT	L171Q	CAG	A238G	GGT	W304N	AAT	F370S	TCT
F040I	ATT	L105W	TGG	L171R	CGT	A238H	CAT	W304P	CCT	F370V	GTG
F040K	AAG	G106A	GCT	L171S	AGT	A238K	AAG	W304Q	CAG	F370Y	TAT
F040L	CTG	G106C	TGT	L171V	GTG	A238L	CTT	W304R	CGG	A371C	TGT
F040N	AAT	G106D	GAT	L171W	TGG	A238P	CCG	W304S	AGT	A371E	GAG
F040Q	CAG	G106E	GAG	L171Y	TAT	A238Q	CAG	W304T	ACT	A371F	TTT
F040R	CGG	G106F	TTT	G172A	GCT	A238R	AGG	W304V	GTG	A371G	GGG
F040S	TCT	G106H	CAT	G172C	TGT	A238S	AGT	W304Y	TAT	A371H	CAT
F040T	ACT	G106I	ATT	G172D	GAT	A238T	ACG	G305C	TGT	A371I	ATT
F040V	GTT	G106L	CTG	G172E	GAG	A238V	GTG	G305D	GAT	A371K	AAG
F040W	TGG	G106M	ATG	G172I	ATT	A238W	TGG	G305E	GAG	A371L	CTT
F040Y	TAT	G106N	AAT	G172L	CTT	A238Y	TAT	G305F	TTT	A371M	ATG
I041A	GCG	G106P	CCT	G172M	ATG	A239C	TGT	G305H	CAT	A371P	CCT
I041C	TGT	G106S	AGT	G172P	CCT	A239F	TTT	G305K	AAG	A371R	CGT
I041D	GAT	G106V	GTG	G172Q	CAG	A239G	GGT	G305L	CTT	A371S	TCG
I041E	GAG	G106W	TGG	G172R	CGT	A239H	CAT	G305N	AAT	A371T	ACT
I041F	TTT	G106Y	TAT	G172S	TCT	A239I	ATT	G305P	CCT	A371V	GTG
I041G	GGG	M107A	GCT	G172T	ACT	A239K	AAG	G305Q	CAG	A371W	TGG
I041H	CAT	M107C	TGT	G172V	GTT	T240K	AAG	G305R	CGT	I372A	GCT
I041N	AAT	M107D	GAT	G172W	TGG	A239L	TTG	G305S	TCG	I372D	GAT
I041P	CCG	M107F	TTT	G172Y	TAT	A239N	AAT	G305T	ACT	I372E	GAG
I041Q	CAG	M107G	GGG	K173D	GAT	A239P	CCT	G305V	GTG	I372F	TTT
I041R	AGG	M107H	CAT	K173E	GAG	A239R	AGG	G305Y	TAT	I372G	GGT
I041S	TCT	M107I	ATT	K173G	GGG	A239S	TCT	T306A	GCT	I372H	CAT
I041T	ACG	M107K	AAG	K173H	CAT	A239T	ACT	T306C	TGT	I372K	AAG
I041V	GTT	M107L	CTT	K173I	ATT	A239V	GTT	T306D	GAT	I372L	CTG
I041W	TGG	M107P	CCT	K173L	CTT	A239W	TGG	T306E	GAG	I372N	AAT
G042A	GCT	M107Q	CAG	K173M	ATG	A239Y	TAT	T306F	TTT	I372P	CCT
G042C	TGT	M107R	CGT	K173N	AAT	T240A	GCG	T306G	GGT	I372R	CGG
G042D	GAT	M107S	TCT	K173P	CCT	T240E	GAG	T306H	CAT	I372S	TCT
G042E	GAG	M107V	GTT	K173Q	CAG	T240F	TTT	T306I	ATT	I372T	ACT
G042H	CAT	M107W	TGG	K173R	CGG	T240G	GGG	T306L	CTG	I372V	GTG
G042I	ATT	A108D	GAT	K173S	TCG	T240L	CTT	T306P	CCT	I372W	TGG
G042K	AAG	A108E	GAG	K173V	GTG	T240M	ATG	T306R	AGG	Q373A	GCT
G042L	CTG	A108F	TTT	K173W	TGG	T240N	AAT	T306S	AGT	Q373C	TGT
G042M	ATG	A108G	GGT	K173Y	TAT	T240P	CCT	T306V	GTG	Q373E	GAG

mut	cod										
G042P	CCT	A108H	CAT	L174A	GCT	T240Q	CAG	T306W	TGG	Q373F	TTT
G042Q	CAG	A108K	AAG	L174C	TGT	T240R	CGT	T306Y	TAT	Q373G	GGT
G042R	CGG	A108L	TTG	L174G	GGG	T240S	AGT	L307C	TGT	Q373H	CAT
G042S	TCT	A108M	ATG	L174H	CAT	T240V	GTG	L307E	GAG	Q373K	AAG
G042T	ACT	A108N	AAT	L174K	AAG	T240W	TGG	L307F	TTT	Q373L	CTG
G042V	GTT	A108P	CCT	L174M	ATG	T240Y	TAT	L307G	GGG	Q373M	ATG
S043A	GCG	A108Q	CAG	L174N	AAT	L241A	GCG	L307I	ATT	Q373N	AAT
S043D	GAT	A108R	CGG	L174P	CCT	L241C	TGT	L307K	AAG	Q373P	CCT
S043E	GAG	A108S	TCT	L174Q	CAG	L241D	GAT	L307N	AAT	Q373R	CGT
S043F	TTT	A108T	ACT	L174R	CGT	L241E	GAG	L307P	CCT	Q373S	TCT
S043G	GGT	A108V	GTG	L174S	TCG	L241F	TTT	L307Q	CAG	Q373T	ACT
S043H	CAT	A108Y	TAT	L174T	ACT	L241G	GGG	L307R	AGG	Q373V	GTT
S043I	ATT	V109A	GCT	L174V	GTT	L241I	ATT	L307S	AGT	Q373W	TGG
S043K	AAG	V109C	TGT	L174W	TGG	L241K	AAG	L307T	ACT	L374A	GCT
S043L	CTT	V109D	GAT	L174Y	TAT	L241P	CCT	L307V	GTG	L374D	GAT
S043N	AAT	V109E	GAG	L175C	TGT	L241Q	CAG	L307W	TGG	L374E	GAG
S043P	CCT	V109F	TTT	L175D	GAT	L241R	CGG	L307Y	TAT	L374G	GGT
S043Q	CAG	V109G	GGG	L175E	GAG	L241S	TCT	S308C	TGT	L374H	CAT
S043R	CGG	V109H	CAT	L175F	TTT	L241T	ACG	S308D	GAT	L374I	ATT
S043T	ACT	V109L	TTG	L175G	GGG	L241V	GTT	S308F	TTT	L374M	ATG
S043V	GTG	V109M	ATG	L175H	CAT	L241W	TGG	S308G	GGT	L374N	AAT
P044A	GCT	V109P	CCT	L175K	AAG	Y242A	GCG	S308H	CAT	L374P	CCT
P044C	TGT	V109Q	CAG	L175N	AAT	Y242C	TGT	S308K	AAG	L374R	AGG
P044E	GAG	V109R	AGG	L175P	CCT	Y242D	GAT	S308L	CTG	L374S	AGT
P044F	TTT	V109T	ACT	L175R	CGT	Y242F	TTT	S308M	ATG	L374T	ACT
P044G	GGG	V109W	TGG	L175S	TCT	Y242G	GGT	S308N	AAT	L374V	GTG
P044H	CAT	V109Y	TAT	L175T	ACT	Y242I	ATT	S308P	CCT	L374W	TGG
P044I	ATT	I110A	GCT	L175V	GTG	Y242K	AAG	S308R	CGG	L374Y	TAT
P044L	CTT	I110C	TGT	L175W	TGG	Y242L	CTT	S308T	ACT	E375A	GCT
P044N	AAT	I110D	GAT	L175Y	TAT	Y242M	ATG	S308V	GTT	E375C	TGT
P044Q	CAG	I110F	TTT	R176A	GCT	Y242P	CCG	S308W	TGG	E375F	TTT
P044R	CGT	I110G	GGG	R176C	TGT	Y242R	CGG	S308Y	TAT	E375G	GGT
P044S	TCT	I110H	CAT	R176E	GAG	Y242S	TCT	I309D	GAT	E375I	ATT
P044T	ACT	I110K	AAG	R176F	TTT	Y242T	ACG	I309E	GAG	E375K	AAG
P044W	TGG	I110L	CTG	R176G	GGG	Y242V	GTT	I309G	GGT	E375L	CTT
P044Y	ACG	I110M	ATG	R176H	CAT	Y242W	TGG	I309H	CAT	E375M	ATG
R045A	GCG	I110N	AAT	R176I	ATT	V243A	GCG	I309K	AAG	E375N	AAT
R045D	GAT	I110P	CCT	R176K	AAG	V243C	TGT	I309L	CTG	E375P	CCT
R045F	TTT	I110R	CGT	R176L	CTT	V243D	GAT	I309M	ATG	E375R	CGT
R045G	GGG	I110S	AGT	R176P	CCT	V243F	TTT	I309N	AAT	E375S	TCT
R045H	CAT	I110V	GTT	R176Q	CAG	V243G	GGG	I309Q	CAG	E375T	ACT
R045I	ATT	I110W	TGG	R176S	AGT	V243H	CAT	I309R	CGT	E375V	GTT
R045K	AAG	D111C	TGT	R176T	ACT	V243L	CTT	I309S	AGT	E375Y	TAT
R045M	ATG	D111E	GAG	R176V	GTG	V243M	ATG	I309T	ACT	K376A	GCT
R045P	CCT	D111G	GGT	R176W	TGG	V243P	CCT	I309V	GTG	K376D	GAT

mut	cod										
R045Q	CAG	D111H	CAT	P177A	GCT	V243Q	CAG	I309W	TGG	K376E	GAG
R045S	TCG	D111I	ATT	P177C	TGT	V243R	AGG	I309Y	TAT	K376G	GGG
R045T	ACG	D111K	AAG	P177D	GAT	V243S	AGT	M310A	GCT	K376I	ATT
R045V	GTG	D111L	TTG	P177F	TTT	V243T	ACG	M310C	TGT	K376L	TTG
R045W	TGG	D111M	ATG	P177G	GGG	V243W	TGG	M310E	GAG	K376M	ATG
R045Y	TAT	D111P	ACT	P177H	CAT	V243Y	TAT	M310F	TTT	K376P	CCT
I046A	GCG	D111Q	CAG	P177L	CTT	R244A	GCG	M310G	GGG	K376Q	CAG
I046C	TGT	D111R	CGG	P177M	ATG	R244D	GAT	M310K	AAG	K376R	CGT
I046E	GAG	D111S	AGT	P177Q	CAG	R244G	GGG	M310L	CTG	K376S	AGT
I046F	TTT	D111T	ACT	P177R	CGG	R244H	CAT	M310N	AAT	K376T	ACT
I046H	CAT	D111V	GTT	P177S	TCT	R244I	ATT	M310P	CCT	K376V	GTG
I046L	CTT	D111W	TGG	P177T	ACT	R244K	AAG	M310Q	CAG	K376W	TGG
I046M	ATG	D111Y	TAT	P177V	GTT	R244M	ATG	M310R	CGG	K376Y	TAT
I046N	AAT	W112C	TGT	P177W	TGG	R244N	AAT	M310S	AGT	G377C	TGT
I046P	CCT	W112D	GAT	P177Y	TAT	R244P	CCT	M310V	GTG	G377D	GAT
I046R	CGT	W112E	GAG	N178A	GCT	R244Q	CAG	M310W	TGG	G377E	GAG
I046S	TCT	W112F	TTT	N178D	GAT	R244S	TCT	M310Y	TAT	G377F	TTT
I046T	ACT	W112G	GGG	N178E	GAG	R244T	ACG	R311A	GCT	G377H	CAT
I046V	GTT	W112H	CAT	N178G	GGG	R244V	GTG	R311C	TGT	G377I	ATT
I046W	TGG	W112I	ATT	N178I	ATT	R244W	TGG	R311E	GAG	G377K	AAG
I046Y	TAT	W112L	CTT	N178K	AAG	R244Y	TAT	R311F	TTT	G377L	CTT
N047A	GCT	W112N	AAT	N178L	TTG	N245A	GCG	R311G	GGT	G377M	ATG
N047D	GAT	W112P	CCT	N178M	ATG	N245C	TGT	R311H	CAT	G377P	CCT
N047F	TTT	W112Q	CAG	N178P	CCT	N245F	TTT	R311I	ATT	G377R	AGG
N047G	GGG	W112R	CGT	N178R	CGG	N245G	GGG	R311K	AAG	G377S	TCG
N047H	CAT	W112S	TCT	N178S	AGT	N245H	CAT	R311L	TTG	G377T	ACT
N047I	ATT	W112V	GTT	N178T	ACT	N245I	ATT	R311P	CCT	G377V	GTG
N047K	AAG	W112Y	TAT	N178V	GTG	N245K	AAG	R311Q	CAG	G377Y	TAT
N047L	CTT	E113A	GCT	N178W	TGG	N245L	CTG	R311S	TCT	G378D	GAT
N047M	ATG	E113C	TGT	N178Y	TAT	N245P	CCG	R311T	ACT	G378E	GAG
N047P	CCT	E113D	GAT	H179A	GCT	N245Q	CAG	R311V	GTG	G378F	TTT
N047Q	CAG	E113F	TTT	H179C	TGT	N245R	CGG	R311W	TGG	G378I	ATT
N047R	CGG	E113G	GGG	H179E	GAG	N245S	TCG	S312A	GCT	G378K	AAG
N047S	TCT	E113H	CAT	H179G	GGG	N245T	ACG	S312C	TGT	G378L	CTG
N047T	ACG	E113L	CTT	H179I	ATT	N245V	GTG	S312E	GAG	G378M	ATG
N047V	GTG	E113P	CCT	H179K	AAG	N245W	TGG	S312F	TTT	G378N	AAT
N047W	TGG	E113Q	CAG	H179L	CTG	R246A	GCG	S312G	GGG	G378Q	CAG
N047Y	TAT	E113R	CGT	H179M	ATG	R246C	TGT	S312H	CAT	G378R	AGG
A048C	TGT	E113S	TCT	H179N	AAT	R246D	GAT	S312K	AAG	G378S	TCT
A048E	GAG	E113T	ACT	H179P	CCT	R246E	GAG	S312L	CTG	G378T	ACT
A048F	TTT	E113V	GTT	H179R	AGG	R246G	GGG	S312M	ATG	G378V	GTG
A048G	GGT	E113W	TGG	H179S	AGT	R246H	CAT	S312N	AAT	G378W	TGG
A048H	CAT	E113Y	CAT	H179T	ACT	R246I	ATT	S312P	CCT	G378Y	TAT
A048I	ATT	E114A	GCT	H179V	GTG	R246K	AAG	S312Q	CAG	K379A	GCT
A048K	AAG	E114C	TGT	H179W	TGG	R246L	TTG	S312R	CGG	K379C	TGT

mut	cod										
A048L	CTG	E114D	GAT	L180A	GCT	R246M	ATG	S312T	ACT	K379E	GAG
A048M	ATG	E114G	GGG	L180C	TGT	R246P	CCT	S312V	GTT	K379F	TTT
A048N	AAT	E114H	CAT	L180E	GAG	R246S	AGT	S312W	TGG	K379G	GGG
A048P	CCT	E114I	ATT	L180F	TTT	R246T	ACG	M313A	GCT	K379H	CAT
A048Q	CAG	E114L	CTG	L180G	GGT	R246V	GTT	M313C	TGT	K379I	ATT
A048R	CGG	E114M	ATG	L180H	CAT	R246W	TGG	M313D	GAT	K379L	CTT
A048S	TCT	E114P	CCT	L180I	ATT	V247A	GCG	M313E	GAG	K379M	ATG
A048V	GTT	E114R	CGG	L180K	AAG	V247C	TGT	M313F	TTT	K379N	AAT
A048W	TGG	E114S	TCT	L180M	ATG	V247F	TTT	M313G	GGG	K379R	CGT
A048Y	TAT	E114T	ACT	L180N	AAT	V247H	CAT	M313H	CAT	K379S	TCT
T049A	GCG	E114V	GTG	L180P	CCT	V247I	ATT	M313K	AAG	K379T	ACT
T049C	TGT	E114W	TGG	L180R	AGG	V247L	CTG	M313L	CTT	K379V	GTT
T049D	GAT	E114Y	TAT	L180S	TCG	V247M	ATG	M313P	CCT	K379W	TGG
T049F	TTT	W115A	GCT	L180T	ACT	V247N	AAT	M313R	CGT	F380A	GCT
T049G	GGG	W115C	TGT	L180W	TGG	V247P	CCT	M313S	TCG	F380C	TGT
T049H	CAT	W115D	GAT	W181A	GCT	V247Q	CAG	M313T	ACT	F380D	GAT
T049I	ATT	W115F	TTT	W181C	TGT	V247R	CGT	M313V	GTT	F380E	GAG
T049K	AAG	W115G	GGT	W181D	GAT	V247S	TCT	M313Y	TAT	F380G	GGG
T049L	TTG	W115H	CAT	W181E	GAG	V247T	ACT	K314A	GCT	F380I	ATT
T049N	AAT	W115I	ATT	W181F	TTT	V247W	TGG	K314C	TGT	F380L	CTT
T049P	CCG	W115K	AAG	W181H	CAT	V247Y	TAT	K314D	GAT	F380P	CCT
T049R	AGG	W115L	CTT	W181I	ATT	R248A	GCT	K314H	CAT	F380Q	CAG
T049S	TCG	W115M	ATG	W181K	AAG	R248C	TGT	K314I	ATT	F380R	CGG
T049V	GTT	W115P	CCT	W181L	CTG	R248D	GAT	K314L	TTG	F380S	AGT
T049W	TGG	W115R	CGG	W181M	ATG	R248E	GAG	K314N	AAT	F380T	ACT
G050A	GCG	W115S	AGT	W181N	AAT	R248G	GGG	K314P	CCT	F380V	GTG
G050C	TGT	W115V	GTG	W181Q	CAG	R248H	CAT	K314Q	CAG	F380W	TGG
G050D	GAT	W115Y	TAT	W181R	CGT	R248I	ATT	K314R	CGG	F380Y	TAT
G050E	GAG	R116A	GCT	W181S	TCT	R248L	CTT	K314S	TCG	T381A	AGC
G050F	TTT	R116C	TGT	W181V	GTG	R248M	ATG	K314T	ACT	T381E	GAG
G050H	CAT	R116D	GAT	G182A	GCT	R248P	CCG	K314V	GTT	T381F	TTT
G050L	CTT	R116E	GAG	G182C	TGT	R248S	TCG	K314W	TGG	T381G	GGT
G050M	ATG	R116G	GGG	G182D	GAT	R248T	ACG	K314Y	TAT	T381H	CAT
G050P	CCT	R116H	CAT	G182E	GAG	R248V	GTG	S315A	GCT	T381K	AAG
G050Q	CAG	R116I	ATT	G182H	CAT	R248W	TGG	S315C	TGT	T381L	TTG
G050R	CGG	R116L	CTG	G182L	CTT	R248Y	TAT	S315E	GAG	T381N	AAT
G050S	AGT	R116N	AAT	G182M	ATG	E249A	GCT	S315G	GGT	T381P	CCT
G050V	GTT	R116P	CCT	G182N	AAT	E249G	GGG	S315H	CAT	T381Q	CAG
G050W	TGG	R116Q	CAG	G182P	CCT	E249H	CAT	S315I	ATT	T381R	CGT
G050Y	TAT	R116S	TCT	G182Q	CAG	E249I	ATT	S315K	AAG	T381S	AGT
Q051A	GCG	R116T	ACT	G182R	CGT	E249K	AAG	S315L	CTG	T381V	GTG
Q051C	TGT	R116V	GTG	G182S	AGT	E249L	CTG	S315M	ATG	T381W	TGG
Q051D	GAT	R116W	TGG	G182T	ACT	E249M	ATG	S315P	CCT	T381Y	TAT
Q051F	TTT	P117D	GAT	G182V	GTT	E249P	CCT	S315R	CGG	V382E	GAG
Q051H	CAT	P117E	GAG	G182Y	TAT	E249Q	CAG	S315T	ACT	V382G	GGG

mut	cod										
Q051I	ATT	P117F	TTT	Y183A	GCT	E249R	CGG	S315V	GTT	V382H	CAT
Q051K	AAG	P117G	GGT	Y183C	TGT	E249S	TCT	S315W	TGG	V382I	ATT
Q051M	ATG	P117H	CAT	Y183D	GAT	E249T	ACT	S315Y	TAT	V382K	AAG
Q051N	AAT	P117I	ATT	Y183E	GAG	E249V	GTG	C316A	GCT	V382L	TTG
Q051P	CCT	P117K	AAG	Y183G	GGG	E249W	TGG	C316D	GAT	V382M	ATG
Q051R	CGG	P117N	AAT	Y183I	ATT	E249Y	TAT	C316E	GAG	V382N	AAT
Q051S	TCT	P117Q	CAG	Y183K	AAG	A250C	TGT	C316G	GGG	V382P	CCT
Q051T	ACG	P117R	AGG	Y183L	TTG	A250F	TTT	C316I	ATT	V382Q	CAG
Q051W	TGG	P117S	TCG	Y183N	AAT	A250G	GGT	C316K	AAG	V382R	CGG
Q051Y	TAT	P117T	ACT	Y183P	CCT	A250H	CAT	C316L	CTG	V382S	TCG
G052A	GCT	P117V	GTT	Y183Q	CAG	A250K	AAG	C316M	ATG	V382T	ACT
G052C	TGT	P117W	TGG	Y183R	CGT	A250L	CTG	C316P	CCT	V382W	TGG
G052E	GAG	P117Y	TAT	Y183S	TCT	A250M	ATG	C316R	AGG	V382Y	TAT
G052F	TTT	T118C	TGT	Y183V	GTT	A250N	AAT	C316S	TCT	R383A	GCT
G052H	CAT	T118D	GAT	Y183W	TGG	A250P	CCT	C316T	ACT	R383E	GAG
G052K	AAG	T118E	GAG	Y184A	GCT	A250Q	CAG	C316V	GTT	R383F	TTT
G052L	CTT	T118G	GGG	Y184C	TGT	A250R	AGG	C316W	TGG	R383G	GGG
G052N	AAT	T118H	CAT	Y184D	GAT	A250S	TCT	C316Y	TAT	R383H	CAT
G052P	CCT	T118K	AAG	Y184E	GAG	A250T	ACG	L317A	GCT	R383I	ATT
G052Q	CAG	T118L	CTG	Y184F	TTT	A250V	GTG	L317C	TGT	R383K	AAG
G052R	CGG	T118M	ATG	Y184G	GGT	A250W	TGG	L317D	GAT	R383L	CTG
G052S	AGT	T118N	AAT	Y184H	CAT	I251C	TGT	L317G	GGG	R383M	ATG
G052T	ACT	T118P	CCT	Y184K	AAG	I251D	GAT	L317H	CAT	R383N	AAT
G052W	TGG	T118Q	CAG	Y184L	CTT	I251F	TTT	L317I	ATT	R383P	CCT
G052Y	TAT	T118R	CGT	Y184M	ATG	I251G	GGG	L317K	AAG	R383S	TCG
V053A	GCG	T118V	GTT	Y184P	CCT	I251H	CAT	L317M	ATG	R383T	ACT
V053C	TGT	T118W	TGG	Y184R	AGG	I251K	AAG	L317N	AAT	R383V	GTG
V053D	GAT	T118Y	TAT	Y184S	TCG	I251L	CTT	L317P	CCT	R383W	TGG
V053E	GAG	W119A	GCT	Y184V	GTG	I251M	ATG	L317Q	CAG	G384A	GCT
V053G	GGG	W119D	GAT	Y184W	TGG	I251P	CCG	L317R	AGG	G384C	TGT
V053H	CAT	W119E	GAG	L185A	GCT	I251Q	CAG	L317S	TCG	G384D	GAT
V053L	CTG	W119F	TTT	L185D	GAT	I251S	AGT	L317T	ACT	G384E	GAG
V053N	AAT	W119G	GGT	L185E	GAG	I251T	ACT	L317W	TGG	G384F	TTT
V053P	CCG	W119I	ATT	L185F	TTT	I251V	GTG	L318C	TGT	G384H	CAT
V053Q	CAG	W119K	AAG	L185G	GGG	I251W	TGG	L318D	GAT	G384I	ATT
V053R	CGG	W119L	CTG	L185I	ATT	I251Y	TAT	L318F	TTT	G384K	AAG
V053S	AGT	W119N	AAT	L185K	AAG	R252A	GCT	L318G	GGG	G384L	CTT
V053T	ACT	W119P	CCT	L185N	AAT	R252D	GAT	L318H	CAT	G384M	ATG
V053W	TGG	W119Q	CAG	L185P	CCT	R252E	GAG	L318I	ATT	G384P	CCT
V053Y	TAT	W119R	CGG	L185R	CGG	R252F	TTT	L318K	AAG	G384Q	CAG
T054A	GCG	W119S	TCT	L185S	TCG	R252G	GGT	L318M	ATG	G384R	AGG
T054D	GAT	W119V	GTT	L185T	ACT	R252H	CAT	L318N	AAT	G384S	TCG
T054E	GAG	W119Y	TAT	L185V	GTG	R252I	ATT	L318P	CCT	G384T	ACT
T054F	TTT	A120C	TGT	L185W	TGG	R252K	AAG	L318Q	CAG	K385A	GCT
T054G	GGG	A120D	GAT	L185Y	TAT	R252L	CTG	L318R	CGG	K385C	TGT

mut	cod										
T054H	CAT	A120F	TTT	F186A	GCT	R252N	AAT	L318S	AGT	K385G	GGG
T054I	ATT	A120G	GGG	F186D	GAT	R252P	CCT	L318T	ACT	K385H	CAT
T054M	ATG	A120H	CAT	F186G	GGT	R252S	TCG	L318W	TGG	K385L	CTT
T054N	AAT	A120I	ATT	F186H	CAT	R252T	ACT	L319C	TGT	K385M	ATG
T054P	CCG	A120L	CTT	F186I	ATT	R252V	GTG	L319E	GAG	K385N	AAT
T054Q	CAG	A120N	AAT	F186K	AAG	R252Y	TAT	L319F	TTT	K385P	CCG
T054R	CGT	A120P	CCT	F186L	CTT	V253A	GCG	L319G	GGG	K385Q	CAG
T054S	AGT	A120R	CGT	F186N	AAT	V253D	GAT	L319H	CAT	K385R	CGT
T054V	GTT	A120S	TCT	F186P	CCT	V253E	GAG	L319I	ATT	K385S	TCT
T054Y	TAT	A120T	ACT	F186Q	CAG	V253G	GGG	L319K	AAG	K385T	ACG
I055A	GCT	A120V	GTG	F186R	AGG	V253H	CAT	L319M	ATG	K385V	GTT
I055C	TGT	A120W	TGG	F186S	TCT	V253I	ATT	L319P	CCT	K385W	TGG
I055D	GAT	A120Y	TAT	F186V	GTT	V253L	CTG	L319Q	CAG	K385Y	TAT
I055F	TTT	R121A	GCT	F186W	TGG	V253M	ATG	L319R	AGG	P386A	GCG
I055G	GGG	R121C	TGT	F186Y	TAT	V253N	AAT	L319S	TCG	P386C	TGT
I055H	CAT	R121D	GAT	P187A	GCT	V253P	CCT	L319V	GTT	P386F	TTT
I055L	CTG	R121E	GAG	P187F	TTT	V253Q	CAG	L319W	TGG	P386G	GGG
I055N	AAT	R121F	TTT	P187G	GGG	V253R	CGG	L319Y	TAT	P386H	CAT
I055P	CCT	R121G	GGT	P187H	CAT	V253S	TCG	D320C	TGT	P386I	ATT
I055Q	CAG	R121H	CAT	P187I	ATT	V253T	ACG	D320E	GAG	P386L	CTT
I055R	CGT	R121K	AAG	P187L	CTT	V253W	TGG	D320F	TTT	P386M	ATG
I055S	TCG	R121L	CTG	P187M	ATG	S254C	TGT	D320G	GGG	P386N	AAT
I055T	ACT	R121M	ATG	P187N	AAT	S254D	GAT	D320H	CAT	P386Q	CAG
I055V	GTT	R121P	CCT	P187Q	CAG	S254E	GAG	D320I	ATT	P386R	CGT
I055Y	TAT	R121S	TCG	P187R	AGG	S254G	GGG	D320K	AAG	P386S	AGT
F056A	GCG	R121T	ACT	P187S	TCG	S254I	ATT	D320L	TTG	P386T	ACG
F056C	TGT	R121V	GTT	P187T	ACT	S254K	AAG	D320M	ATG	P386V	GTT
F056E	GAG	R121W	TGG	P187V	GTT	S254L	TTG	D320N	AAT	P386Y	TAT
F056G	GGG	R121Y	TAT	P187W	TGG	S254N	AAT	D320P	CCT	T387C	TGT
F056H	CAT	N122A	GCT	P187Y	TAT	S254P	CCT	D320R	AGG	T387E	GAG
F056I	ATT	N122C	TGT	D188A	GCT	S254Q	CAG	D320S	AGT	T387F	TTT
F056K	AAG	N122E	GAG	D188C	TGT	S254R	CGG	D320V	GTG	T387G	GGG
F056L	TTG	N122F	TTT	D188F	TTT	S254T	ACT	D320W	TGG	T387H	CAT
F056N	AAT	N122I	ATT	D188G	GGG	S254V	GTG	D320Y	TAT	T387I	ATT
F056P	CCG	N122K	AAG	D188H	CAT	S254W	TGG	N321A	GCT	T387K	AAG
F056R	CGT	N122L	CTG	D188L	CTT	S254Y	TAT	N321D	GAT	T387L	CTG
F056S	TCT	N122M	ATG	D188M	ATG	K255A	GCG	N321E	GAG	T387M	ATG
F056T	ACT	N122P	CCT	D188N	AAT	K255C	TGT	N321G	GGT	T387N	AAT
F056V	GTT	N122Q	CAG	D188P	CCT	K255D	GAT	N321H	CAT	T387Q	CAG
F056W	TGG	N122R	CGG	D188Q	CAG	K255G	GGT	N321I	ATT	T387S	TCG
Y057A	GCT	N122S	TCT	D188R	AGG	K255H	CAT	N321K	AAG	T387V	GTT
Y057D	GAT	N122T	ACT	D188S	AGT	K255L	TTG	N321L	CTG	T387W	TGG
Y057E	GAG	N122V	GTT	D188T	ACT	K255N	AAT	N321M	ATG	T387Y	TAT
Y057F	TTT	N122W	TGG	D188V	GTG	K255P	CCG	N321P	CCT	L388A	GCG
Y057G	GGG	W123A	GCT	D188W	TGG	K255Q	CAG	N321R	CGG	L388C	TGT

mut	cod										
Y057I	ATT	W123C	TGT	C189A	GCT	K255R	CGG	N321S	TCT	L388F	TTT
Y057L	TTG	W123D	GAT	C189E	GAG	K255S	TCG	N321T	ACT	L388G	GGG
Y057M	ATG	W123E	GAG	C189G	GGT	K255T	ACT	N321V	GTG	L388H	CAT
Y057P	CCG	W123G	GGG	C189H	CAT	K255V	GTT	N321Y	TAT	L388I	ATT
Y057Q	CAG	W123H	CAT	C189K	AAG	K255W	TGG	Y322C	TGT	L388M	ATG
Y057R	CGG	W123L	CTT	C189L	TTG	K255Y	TAT	Y322D	GAT	L388P	CCT
Y057S	AGT	W123M	ATG	C189M	ATG	I256A	GCT	Y322E	GAG	L388Q	CAG
Y057T	ACG	W123P	CCT	C189N	ACT	I256C	TGT	Y322F	TTT	L388R	CGT
Y057V	GTG	W123Q	CAG	C189P	CCT	I256D	GAT	Y322G	GGT	L388S	TCG
Y057W	TGG	W123R	AGG	C189R	AGG	I256E	GAG	Y322H	CAT	L388T	ACG
V058A	GCT	W123S	AGT	C189S	TCG	I256G	GGG	Y322I	ATT	L388V	GTT
V058C	TGT	W123T	ACT	C189T	ACT	I256H	CAT	Y322L	CTG	L388W	TGG
V058D	GAT	W123V	GTT	C189V	GTG	I256L	CTT	Y322N	AAT	L388Y	TAT
V058G	GGT	W123Y	TAT	C189W	TGG	I256M	ATG	Y322P	CCT	E389A	GCT
V058H	CAT	K124A	GCT	C189Y	TAT	I256N	AAT	Y322R	CGT	E389F	TTT
V058I	ATT	K124C	TGT	Y190C	TGT	I256P	CCG	Y322S	TCT	E389G	GGT
V058K	AAG	K124D	GAT	Y190E	GAG	I256Q	CAG	Y322T	ACT	E389H	CAT
V058L	CTT	K124E	GAG	Y190F	TTT	I256R	AGG	Y322V	GTG	E389I	ATT
V058N	AAT	K124F	TTT	Y190G	GGG	I256T	ACG	Y322W	TGG	E389K	AAG
V058P	CCT	K124G	GGG	Y190H	CAT	I256V	GTT	M323A	GCT	E389L	CTG
V058Q	CAG	K124H	CAT	Y190K	AAG	I256W	TGG	M323C	TGT	E389M	ATG
V058R	CGG	K124I	ATT	Y190L	CTT	P257A	GCG	M323E	GAG	E389P	CCT
V058S	TCG	K124L	CTT	Y190N	AAT	P257C	TGT	M323F	TTT	E389Q	CAG
V058W	TGG	K124N	AAT	Y190P	CCT	P257D	GAT	M323G	GGG	E389R	CGG
V058Y	TAT	K124P	CCT	Y190Q	CAG	P257G	GGG	M323H	CAT	E389S	TCG
D059A	GCT	K124R	CGG	Y190R	CGT	P257I	ATT	M323I	ATT	E389T	ACT
D059E	GAG	K124S	TCT	Y190S	TCT	P257K	AAG	M323K	AAG	E389V	GTT
D059G	GGG	K124T	ACT	Y190T	ACT	P257L	CTT	M323L	TTG	E389Y	TAT
D059H	CAT	K124V	GTG	Y190V	GTG	P257M	ATG	M323N	AAT	D390A	GCG
D059I	ATT	K124W	TGG	Y190W	TGG	P257N	AAT	M323P	CCT	D390C	TGT
D059L	CTT	P125A	GCT	N191A	GCT	P257Q	CAG	M323R	CGG	D390E	GAG
D059M	ATG	P125C	TGT	N191E	GAG	P257R	CGT	M323S	AGT	D390F	TTT
D059N	AAT	P125D	GAT	N191F	TTT	P257S	TCG	M323T	ACT	D390G	GGG
D059P	CCT	P125G	GGG	N191G	GGG	P257T	ACG	M323V	GTT	D390H	CAT
D059Q	CAG	P125H	CAT	N191K	AAG	P257V	GTG	E324A	GCT	D390L	CTT
D059R	CGT	P125I	ATT	N191L	TTG	P257W	TGG	E324C	TGT	D390N	AAT
D059T	ACG	P125L	CTT	N191M	ATG	D258A	GCG	E324D	GAT	D390P	CCG
D059V	GTG	P125N	AAT	N191P	CCT	D258E	GAG	E324F	TTT	D390R	CGG
D059W	TGG	P125Q	CAG	N191Q	CAG	D258G	GGG	E324G	GGG	D390S	AGT
D059Y	TAT	P125R	CGT	N191R	CGG	D258H	CAT	E324H	CAT	D390T	ACT
R060A	GCG	P125S	TCG	N191S	TCG	D258I	ATT	E324L	TTG	D390V	GTG
R060D	GAT	P125T	ACT	N191T	ACT	D258L	CTT	E324M	ATG	D390W	TGG
R060F	TTT	P125V	GTG	N191V	GTT	D258N	AAT	E324N	AAT	D390Y	TAT
R060G	GGT	P125W	TGG	N191W	TGG	D258P	CCG	E324P	CCT	L391A	GCT
R060H	CAT	P125Y	TAT	N191Y	TAT	D258Q	CAG	E324R	CGG	L391C	TGT

mut	cod										
R060I	ATT	K126A	GCT	H192C	TGT	D258R	CGT	E324S	AGT	L391D	GAT
R060K	AAG	K126D	GAT	H192F	TTT	D258S	AGT	E324V	GTG	L391G	GGG
R060L	CTT	K126E	GAG	H192G	GGT	D258T	ACG	E324W	TGG	L391H	CAT
R060N	AAT	K126F	TTT	H192K	AAG	D258V	GTG	E324Y	TAT	L391K	AAG
R060P	CCG	K126G	GGT	H192L	CTT	D258W	TGG	T325A	GCT	L391N	AAT
R060Q	CAG	K126H	CAT	H192M	ATG	D258Y	TAT	T325C	TGT	L391P	CCT
R060S	TCG	K126I	ATT	H192N	AAT	A259E	GAG	T325D	GAT	L391Q	CAG
R060T	ACG	K126L	CTG	H192P	CCT	A259G	GGG	T325E	GAG	L391R	CGG
R060V	GTT	K126M	ATG	H192Q	CAG	A259I	ATT	T325G	GGT	L391S	TCT
R060Y	TAT	K126N	AAT	H192R	CGT	A259K	AAG	T325H	CAT	L391T	ACT
L061A	GCT	K126P	CCT	H192S	TCG	A259L	TTG	T325I	ATT	L391V	GTG
L061E	GAG	K126Q	CAG	H192T	ACT	A259M	ATG	T325K	AAG	L391W	TGG
L061F	TTT	K126R	AGG	H192V	GTT	A259N	AAT	T325M	ATG	L391Y	TAT
L061G	GGG	K126S	TCT	H192W	TGG	A259P	CCT	T325N	AAT	E392A	GCT
L061H	CAT	K126T	ACT	H192Y	TAT	A259Q	CAG	T325Q	CAG	E392C	TGT
L061I	ATT	K126V	GTG	H193A	GCT	A259R	CGT	T325R	CGG	E392F	TTT
L061M	ATG	K126W	TGG	H193C	TGT	A259S	AGT	T325S	TCG	E392G	GGG
L061N	AAT	K126Y	TAT	H193D	GAT	A259T	ACT	T325V	GTG	E392K	AAG
L061P	CCT	D127A	GCT	H193F	TTT	A259V	GTG	T325W	TGG	E392L	CTG
L061Q	CAG	D127E	GAG	H193G	GGG	A259W	TGG	I326A	GCT	E392M	ATG
L061R	AGG	D127F	TTT	H193K	AAG	A259Y	TAT	I326C	TGT	E392P	CCT
L061T	ACT	D127G	GGT	H193L	TTG	K260A	GCG	I326D	GAT	E392Q	CAG
L061V	GTT	D127H	CAT	H193M	ATG	K260C	TGT	I326E	GAG	E392R	AGG
L061W	TGG	D127K	AAG	H193P	CCG	K260D	GAT	I326G	GGG	E392S	AGT
L061Y	TAT	D127L	CTG	H193Q	CAG	K260E	GAG	I326H	CAT	E392T	ACT
G062A	GCG	D127M	ATG	H193R	AGG	K260G	GGG	I326K	AAG	E392V	GTT
G062C	TGT	D127N	AAT	H193S	TCT	K260H	CAT	I326L	CTT	E392W	TGG
G062D	GAT	D127Q	CAG	H193T	ACG	K260L	TTG	I326N	AAT	E392Y	TAT
G062F	TTT	D127R	CGT	H193V	GTG	K260M	ATG	I326P	CCT	Q393A	GCG
G062I	ATT	D127S	AGT	H193Y	TAT	K260P	CCG	I326R	CGG	Q393C	TGT
G062K	AAG	D127T	ACT	Y194A	GCT	K260Q	CAG	I326S	TCT	Q393D	GAT
G062L	CTT	D127V	GTT	Y194C	TGT	K260R	CGG	I326V	GTG	Q393F	TTT
G062M	ATG	D127W	TGG	Y194E	GAG	K260S	TCT	I326W	TGG	Q393G	GGT
G062P	CCT	V128A	GCT	Y194F	TTT	K260V	GTT	I326Y	TAT	Q393H	CAT
G062Q	CAG	V128C	TGT	Y194G	GGG	K260W	TGG	L327A	GCT	Q393I	ATT
G062R	CGT	V128E	GAG	Y194I	ATT	K260Y	TAT	L327D	GAT	Q393K	AAG
G062S	AGT	V128F	TTT	Y194L	TTG	S261A	GCG	L327E	GAG	Q393L	TTG
G062T	ACT	V128G	GGG	Y194N	AAT	S261E	GAG	L327F	TTT	Q393M	ATG
G062V	GTG	V128H	CAT	Y194P	CCT	S261F	TTT	L327G	GGG	Q393N	AAT
G062Y	TAT	V128I	ATT	Y194Q	CAG	S261G	GGG	L327H	CAT	Q393P	CCG
Y063A	GCG	V128K	AAG	Y194R	AGG	S261I	ATT	L327M	ATG	Q393R	CGT
Y063C	TGT	V128L	CTG	Y194S	TCG	S261K	AAG	L327N	AAT	Q393S	TCG
Y063G	GGT	V128P	CCT	Y194T	ACG	S261L	CTT	L327Q	CAG	Q393T	ACG
Y063H	CAT	V128Q	CAG	Y194V	GTG	S261M	ATG	L327R	CGG	F394A	GCG
Y063I	ATT	V128R	AGG	Y194W	TGG	S261N	AAT	L327S	AGT	F394D	GAT

mut	cod										
Y063K	AAG	V128S	TCG	K195A	GCG	S261P	CCT	L327T	ACT	F394E	GAG
Y063L	CTG	V128W	TGG	K195E	GAG	S261Q	CAG	L327V	GTG	F394G	GGG
Y063M	ATG	V128Y	TAT	K195F	TTT	S261R	CGT	L327W	TGG	F394I	ATT
Y063N	AAT	Y129A	GCT	K195G	GGT	S261T	ACT	L327Y	TAT	F394K	AAG
Y063P	CCT	Y129C	TGT	K195H	CAT	S261V	GTT	N328A	GCT	F394L	CTG
Y063R	AGG	Y129D	GAT	K195I	ATT	S261W	TGG	N328C	TGT	F394N	AAT
Y063S	TCT	Y129E	GAG	K195L	TTG	P262A	GCG	N328D	GAT	F394P	CCG
Y063T	ACG	Y129G	GGG	K195N	AAT	P262D	GAT	N328E	GGT	F394Q	CAG
Y063V	GTG	Y129H	CAT	K195Q	CAG	P262E	GAG	N328H	CAT	F394R	CGT
Y063W	TGG	Y129L	TTG	K195R	CGT	P262F	TTT	N328I	ATT	F394S	TCG
Y064A	GCT	Y129M	ATG	K195S	TCT	P262G	GGG	N328K	AAG	F394T	ACT
Y064C	TGT	Y129P	CCT	K195T	ACT	P262H	CAT	N328L	CTT	F394V	GTT
Y064D	GAT	Y129Q	CAG	K195V	GTG	P262I	ATT	N328Q	CAG	F394W	TGG
Y064E	GAG	Y129R	CGG	K195W	TGG	P262K	AAG	N328R	AGG	S395A	GCG
Y064F	TTT	Y129S	AGT	K195Y	TAT	P262Q	CAG	N328S	AGT	S395C	TGT
Y064G	GGT	Y129T	ACT	K196A	GCT	P262R	CGT	N328T	ACT	S395D	GAT
Y064H	CAT	Y129V	GTT	K196C	TGT	P262S	TCT	N328V	GTG	S395E	GAG
Y064I	ATT	Y129W	TGG	K196D	GAT	P262T	ACT	N328W	TGG	S395G	GGG
Y064K	AAG	K130C	TGT	K196E	GAG	P262V	GTG	N328Y	TAT	S395H	CAT
Y064L	CTT	K130D	GAT	K196G	GGG	P262W	TGG	P329C	TGT	S395K	AAG
Y064P	CCT	K130E	GAG	K196I	ATT	P262Y	TAT	P329F	TTT	S395L	CTT
Y064Q	CAG	K130G	GGG	K196L	TTG	L263A	GCT	P329G	GGT	S395M	ATG
Y064R	CGG	K130H	CAT	K196N	AAT	L263E	GAG	P329H	CAT	S395P	CCT
Y064S	AGT	K130I	ATT	K196P	CCG	L263F	TTT	P329I	ATT	S395R	CGG
Y064T	ACT	K130L	TTG	K196R	CGT	L263G	GGG	P329K	AAG	S395T	ACG
Y064V	GTT	K130N	AAT	K196S	TCG	L263H	CAT	P329L	CTG	S395V	GTT
Y064W	TGG	K130Q	CAG	K196T	ACT	L263K	AAG	P329N	AAT	S395W	TGG
P065A	GCT	K130R	AGG	K196V	GTG	L263M	ATG	P329Q	CAG	S395Y	TAT
P065C	TGT	K130S	TCT	K196W	TGG	L263N	AAT	P329R	CGT	E396A	GCG
P065D	GAT	K130T	ACT	K196Y	TAT	L263P	CCG	P329S	AGT	E396C	TGT
P065F	TTT	K130V	GTG	P197A	GCT	L263Q	CAG	P329T	ACT	E396D	GAT
P065G	GGG	K130W	TGG	P197C	TGT	L263R	CGG	P329V	GTT	E396F	TTT
P065H	CAT	K130Y	TAT	P197D	GAT	L263S	AGT	P329W	TGG	E396G	GGG
P065I	ATT	N131C	TGT	P197E	GAG	L263T	ACT	P329Y	TAT	E396H	CAT
P065K	AAG	N131E	GAG	P197F	TTT	L263V	GTT	Y330A	GCT	E396I	ATT
P065N	AAT	N131F	TTT	P197G	GGT	L263W	TGG	Y330C	TGT	E396L	CTT
P065R	CGG	N131G	GGG	P197H	CAT	P264A	GCG	Y330D	GAT	E396P	CCG
P065S	TCG	N131H	CAT	P197K	AAG	P264D	GAT	Y330E	GAG	E396Q	CAG
P065T	ACG	N131I	ATT	P197L	TTG	P264E	GAG	Y330F	TTT	E396R	AGG
P065V	GTT	N131L	CTT	P197M	ATG	P264F	TTT	Y330G	GGT	E396S	TCT
P065W	TGG	N131M	ATG	P197Q	CAG	P264G	GGT	Y330I	ATT	E396T	ACT
P065Y	TAT	N131P	CCT	P197R	CGT	P264H	CAT	Y330L	CTG	E396V	GTG
Y066A	GCG	N131Q	CAG	P197S	AGT	P264L	CTT	Y330M	ATG	E396Y	TAT
Y066C	TGT	N131R	CGG	P197T	ACT	P264M	ATG	Y330N	AAT	K397A	GCT
Y066D	GAT	N131S	AGT	P197W	TGG	P264N	AAT	Y330P	CCT	K397C	TGT

mut	cod										
Y066E	GAG	N131T	ACT	G198A	GCT	P264R	CGG	Y330R	AGG	K397E	GAG
Y066G	GGT	N131V	GTG	G198C	TGT	P264S	AGT	Y330S	AGT	K397F	TTT
Y066H	CAT	N131Y	TAT	G198D	GAT	P264T	ACT	Y330V	GTT	K397G	GGT
Y066I	ATT	R132A	GCT	G198E	GAG	P264V	GTT	I331V	GTG	K397I	ATT
Y066K	AAG	R132C	TGT	G198H	CAT	P264W	TGG	Y330W	TGG	K397L	TTG
Y066L	CTG	R132E	GAG	G198L	CTG	P264Y	TAT	I331A	GCT	K397M	ATG
Y066N	AAT	R132F	TTT	G198N	AAT	V265A	GCG	I331C	TGT	K397N	AAT
Y066P	CCT	R132H	CAT	G198P	CCG	V265C	TGT	I331D	GAT	K397P	CCG
Y066R	CGG	R132I	ATT	G198Q	CAG	V265D	GAT	I331E	GAG	K397Q	CAG
K397T	ACT	R132K	AAG	G198R	AGG	V265E	GAG	I331F	TTT	K397R	AGG
K397V	GTT	R132L	TTG	G198S	TCT	V265F	TTT	I331H	CAT	K397S	TCG
F398A	GCT	L406P	CCT	K415G	GGT	C423T	ACT	A432L	TTG	E441D	GAT
F398C	TGT	L406Q	CAG	K415L	CTG	C423V	GTG	A432M	ATG	E441F	TTT
F398E	GAG	L406R	CGG	K415M	ATG	C423W	TGG	A432N	AAT	E441G	GGG
F398G	GGT	L406S	AGT	K415P	CCG	I424A	GCT	A432P	CCT	E441H	CAT
F398H	CAT	L406T	ACG	K415Q	CAG	I424C	TGT	A432R	AGG	E441K	AAG
F398I	ATT	L406V	GTT	K415R	CGG	I424E	GAG	A432S	TCT	E441L	CTT
F398L	CTT	L406Y	TAT	K415S	TCT	I424G	GGG	A432V	GTG	E441N	AAT
F398N	AAT	S407A	GCG	K415T	ACT	I424H	CAT	A432Y	TAT	E441Q	CAG
F398P	CCT	S407D	GAT	K415V	GTG	I424K	AAG	F433A	GCT	E441R	CGG
F398R	AGG	S407E	GAG	K415W	TGG	I424L	CTT	F433C	TGT	E441S	AGT
F398S	TCT	S407F	TTT	K415Y	TAT	I424N	AAT	F433D	GAT	E441T	ACT
F398T	ACT	S407G	GGT	D416C	TGT	I424Q	CAG	F433E	GAG	E441V	GTG
F398V	GTT	S407H	CAT	D416F	TTT	I424R	CGG	F433G	GGG	E441Y	TAT
F398W	TGG	S407L	CTG	D416G	GGT	I424S	TCG	F433H	CAT	E442C	TGT
F398Y	TAT	S407M	ATG	D416H	CAT	I424T	ACT	F433I	ATT	E442G	GGG
Y399A	GCG	S407N	AAT	D416I	ATT	I424V	GTT	F433K	AAG	E442H	CAT
Y399C	TGT	S407P	CCT	D416K	AAG	I424W	TGG	F433L	TTG	E442K	AAG
Y399D	GAT	S407Q	CAG	D416L	CTT	I424Y	TAT	F433P	CCT	E442L	CTT
Y399E	GAG	S407R	CGG	D416N	AAT	A425C	TGT	F433R	CGG	E442M	ATG
Y399G	GGG	S407T	ACG	D416Q	CAG	A425D	GAT	F433S	AGT	E442N	AAT
Y399K	AAG	S407V	GTG	D416R	CGG	A425E	GAG	F433T	ACT	E442P	CCT
Y399M	ATG	S407W	TGG	D416S	TCT	A425G	GGT	F433V	GTG	E442Q	CAG
Y399N	AAT	C408A	GCG	D416T	ACG	A425I	ATT	F433W	TGG	E442R	CGG
Y399P	CCT	C408E	GAG	D416V	GTG	A425K	AAG	L434F	TTT	E442S	AGT
Y399Q	CAG	C408F	TTT	D416W	TGG	A425L	TTG	L434G	GGT	E442T	ACT
Y399R	CGG	C408G	GGG	D416Y	TAT	A425M	ATG	L434H	CAT	E442V	GTG
Y399S	TCG	C408I	ATT	T417A	GCT	A425N	AAT	L434I	ATT	E442W	TGG
Y399T	ACG	C408K	AAG	T417D	GAT	A425P	CCT	L434K	AAG	E442Y	TAT
Y399V	GTT	C408L	CTT	T417E	GAG	A425R	AGG	L434M	ATG	P443A	GCT
Y399W	TGG	C408N	AAT	T417F	TTT	A425S	AGT	L434N	AAT	P443D	GAT
C400A	GCG	C408P	CCT	T417G	GGG	A425V	GTG	L434P	CCT	P443E	GAG
C400D	GAT	C408R	CGT	T417H	CAT	A425W	TGG	L434Q	CAG	P443F	TTT
C400E	GAG	C408S	TCG	T417I	ATT	A425Y	TAT	L434R	CGG	P443G	GGG
C400F	TTT	C408T	ACT	T417K	AAG	D426A	GCT	L434S	AGT	P443H	CAT

mut	cod										
C400G	GGG	C408V	GTT	T417L	TTG	D426C	TGT	L434T	ACT	P443I	ATT
C400I	ATT	C408W	TGG	T417M	ATG	D426E	GAG	L434V	GTT	P443L	CTT
C400L	CTG	C408Y	TAT	T417P	CCT	D426F	TTT	L434W	TGG	P443M	ATG
C400M	ATG	K409A	GCG	T417Q	CAG	D426G	GGG	L434Y	TAT	P443N	AAT
C400P	CCG	K409C	TGT	T417R	CGT	D426I	ATT	K435A	GCT	P443Q	CAG
C400Q	CAG	K409D	GAT	T417S	TCG	D426K	AAG	K435C	TGT	P443R	AGG
C400R	CGG	K409E	GAG	T417W	TGG	D426L	CTG	K435E	GAG	P443S	TCT
C400S	AGT	K409G	GGT	D418A	GCT	D426M	ATG	K435F	TTT	P443T	ACT
C400T	ACG	K409H	CAT	D418C	TGT	D426N	AAT	K435G	GGT	P443W	TGG
C400V	GTG	K409I	ATT	D418E	GAG	D426P	CCT	K435H	CAT	Q444C	TGT
C400Y	TAT	K409L	CTG	D418F	TTT	D426Q	CAG	K435I	ATT	Q444D	GAT
S401A	GCT	K409P	CCG	D418G	GGT	D426R	CGT	K435L	CTG	Q444E	GAG
S401C	TGT	K409Q	CAG	D418I	ATT	D426S	TCG	K435P	CCT	Q444F	TTT
S401D	GAT	K409R	AGG	D418L	TTG	D426Y	TAT	K435R	AGG	Q444G	GGG
S401E	GAG	K409S	TCG	D418M	ATG	G427A	GCT	K435S	TCT	Q444H	CAT
S401F	TTT	K409T	ACG	D418N	AAT	G427C	TGT	K435T	ACT	Q444I	ATT
S401G	GGG	K409V	GTG	D418P	CCT	G427F	TTT	K435V	GTT	Q444K	AAG
S401H	CAT	K409W	TGG	D418Q	CAG	G427H	CAT	K435W	TGG	Q444L	CTG
S401K	AAG	A412Y	TAT	D418R	CGG	G427I	ATT	K435Y	TAT	Q444M	ATG
S401L	CTT	E410D	GAT	D418S	TCG	G427K	AAG	P436C	TGT	Q444N	AAT
S401N	AAT	E410G	GGG	D418V	GTG	G427L	CTG	P436D	GAT	Q444R	CGG
S401Q	CAG	E410I	ATT	D418Y	TAT	G427P	CCT	P436E	GAG	Q444V	GTT
S401R	CGT	E410K	AAG	A419D	GAT	G427Q	CAG	P436G	GGG	Q444W	TGG
S401T	ACT	E410L	CTT	A419E	GAG	G427R	CGT	P436H	CAT	Q444Y	TAT
S401W	TGG	E410M	ATG	A419F	TTT	G427S	AGT	P436I	ATT	I445A	GCT
S401Y	TAT	E410N	AAT	A419G	GGG	G427T	ACT	P436K	AAG	I445C	TGT
C402A	GCT	E410P	CCG	A419H	CAT	G427V	GTG	P436L	CTG	I445D	GAT
C402D	GAT	E410Q	CAG	A419I	ATT	G427W	TGG	P436M	ATG	I445G	GGG
C402E	GAG	E410R	CGT	A419K	AAG	G427Y	TAT	P436Q	CAG	I445H	CAT
C402F	TTT	E410S	TCG	A419L	CTT	V428A	GCT	P436R	CGG	I445K	AAG
C402G	GGG	E410T	ACG	A419N	AAT	V428C	TGT	P436S	TCT	I445L	CTT
C402L	TTG	E410V	GTG	A419P	CCT	V428D	GAT	P436T	ACT	I445M	ATG
C402M	ATG	E410W	TGG	A419R	CGG	V428E	GAG	P436W	TGG	I445N	AAT
C402P	CCT	E410Y	TAT	A419S	TCT	V428F	TTT	P436Y	TAT	I445P	CCT
C402Q	CAG	K411A	GCT	A419T	ACT	V428G	GGT	P437A	GCT	I445Q	CAG
C402R	CGG	K411D	GAT	A419W	TGG	V428H	CAT	P437D	GAT	I445R	AGG
C402S	TCT	K411E	GAG	A419Y	TAT	V428L	CTT	P437F	TTT	I445S	AGT
C402T	ACG	K411F	TTT	V420A	GCT	V428M	ATG	P437G	GGT	I445T	ACT
C402V	GTT	K411G	GGG	V420D	GAT	V428N	AAT	P437H	CAT	I445V	GTG
C402W	TGG	K411H	CAT	V420F	TTT	V428P	CCT	P437I	ATT	I445W	TGG
C402Y	TAT	K411I	ATT	V420G	GGT	V428R	CGG	P437K	AAG	I445Y	TAT
Y403A	GCT	K411L	CTG	V420H	CAT	V428S	TCG	P437L	CTG	F446A	GCT
Y403C	TGT	K411N	AAT	V420I	ATT	V428T	ACT	P437M	ATG	F446C	TGT
Y403E	GAG	K411P	CCT	V420K	AAG	V428Y	TAT	P437Q	CAG	F446D	GAT
Y403F	TTT	K411R	AGG	V420L	CTT	C429A	GCT	P437R	CGT	F446E	GAG

mut	cod										
Y403G	GGT	K411S	TCG	V420N	AAT	C429D	GAT	P437S	TCT	F446G	GGG
Y403H	CAT	K411T	ACT	V420P	CCT	C429G	GGT	P437T	ACT	F446H	CAT
Y403K	AAG	K411V	GTT	V420R	AGG	C429I	ATT	P437W	TGG	F446I	ATT
Y403L	TTG	K411W	TGG	V420S	TCT	C429K	AAG	P437Y	TAT	F446K	AAG
Y403M	ATG	A412D	GAT	V420T	ACT	C429L	TTG	M438A	GCT	F446L	TTG
Y403N	AAT	A412E	GAG	V420W	TGG	C429M	ATG	M438C	TGT	F446M	ATG
Y403P	CCG	A412G	GGG	V420Y	TAT	C429N	AAT	M438D	GAT	F446Q	CAG
Y403Q	CAG	A412H	CAT	D421A	GCT	C429P	CCT	M438E	GAG	F446R	CGG
Y403R	CGG	A412I	ATT	D421E	GAG	C429R	CGG	M438G	GGG	F446T	ACT
Y403S	TCT	A412L	CTG	D421G	GGT	C429S	TCG	M438L	TTG	F446V	GTT
Y403T	ACG	A412N	AAT	D421H	CAT	C429T	ACT	M438N	AAT	F446W	TGG
S404A	GCT	A412P	CCT	D421I	ATT	C429V	GTT	M438P	CCT	Y447D	GAT
S404C	TGT	A412Q	CAG	D421K	AAG	C429W	TGG	M438Q	CAG	Y447E	GAG
S404D	GAT	A412R	CGG	D421L	TTG	C429Y	TAT	M438R	AGG	Y447F	TTT
S404F	TTT	A412S	AGT	D421M	ATG	I430A	GCT	M438S	TCG	Y447G	GGT
S404G	GGT	A412V	GTT	D421N	AAT	I430D	GAT	M438T	ACT	Y447I	ATT
S404H	CAT	A412W	TGG	D421Q	CAG	I430E	GAG	M438V	GTG	Y447K	AAG
S404L	CTT	D413A	GCG	D421R	CGG	I430G	GGG	M438W	TGG	Y447L	CTT
S404M	ATG	D413E	GAG	D421S	TCG	I430H	CAT	M438Y	TAT	Y447M	ATG
S404N	AAT	D413F	TTT	D421T	ACT	I430K	AAG	E439A	GCT	Y447N	AAT
S404P	CCT	D413G	GGT	D421W	TGG	I430L	TTG	E439C	TGT	Y447P	CCT
S404R	AGG	D413H	CAT	D421Y	TAT	I430M	ATG	E439F	TTT	Y447Q	CAG
S404T	ACG	D413I	ATT	V422A	GCT	I430N	AAT	E439G	GGG	Y447R	AGG
S404V	GTG	D413K	AAG	V422C	TGT	I430P	CCT	E439H	CAT	Y447T	ACT
S404W	TGG	D413L	CTG	V422D	GAT	I430R	AGG	E439K	AAG	Y447V	GTT
S404Y	TAT	D413N	AAT	V422E	GAG	I430S	TCT	E439L	CTT	Y447W	TGG
T405A	GCG	D413P	CCG	V422G	GGG	I430T	ACT	E439N	AAT		
T405C	TGT	D413Q	CAG	V422H	CAT	I430V	GTT	E439P	CCT		
T405F	TTT	D413R	CGT	V422I	ATT	I430W	TGG	E439Q	CAG		
T405G	GGG	D413S	TCG	V422L	CTG	D431A	GCT	E439R	CGG		
T405I	ATT	D413T	ACT	V422M	ATG	D431E	GAG	E439S	TCG		
T405K	AAG	D413W	TGG	V422N	AAT	D431G	GGT	E439T	ACT		
T405L	TTG	V414A	GCG	V422P	CCT	D431H	CAT	E439V	GTT		
T405M	ATG	V414D	GAT	V422Q	CAG	D431I	ATT	E439W	TGG		
T405P	CCG	V414E	GAG	V422R	CGT	D431K	AAG	T440A	GCT		
T405Q	CAG	V414F	TTT	V422S	TCG	D431L	CTT	T440D	GAT		
T405R	CGT	V414G	GGT	V422T	ACT	D431N	AAT	T440E	GAG		
T405S	TCT	V414H	CAT	V422W	TGG	D431P	CCT	T440F	TTT		
T405V	GTG	V414I	ATT	V422Y	TAT	D431Q	CAG	T440G	GGG		
T405W	TGG	V414K	AAG	C423A	GCT	D431R	CGT	T440H	CAT		
T405Y	TAT	V414L	TTG	C423D	GAT	D431S	TCT	T440I	ATT		
L406A	GCT	V414M	ATG	C423E	GAG	D431V	GTT	T440L	CTT		
L406C	TGT	V414Q	CAG	C423F	TTT	D431W	TGG	T440M	ATG		
L406D	GAT	V414R	AGG	C423G	GGG	D431Y	TAT	T440P	CCT		
L406E	GAG	V414S	TCG	C423H	CAT	A432C	TGT	T440Q	CAG		
mut	cod										
L406F	TTT	V414T	ACT	C423L	CTG	A432E	GAG	T440R	AGG		
L406G	GGT	V414Y	TAT	C423M	ATG	A432F	TTT	T440S	AGT		
L406I	ATT	K415A	GCG	C423P	CCT	A432G	GGG	T440V	GTG		
L406N	AAT	K415C	TGT	C423Q	CAG	A432H	CAT	T440Y	TAT		
		K415D	GAT	C423R	AGG	A432I	ATT	E441A	GCT		
		K415E	GAG	C423S	TCG	A432K	AAG	E441C	TGT		

2. Экспрессия.

Для экспрессии каждого мутанта плазмидной ДНК HZ24-PH20-IRES-SEAP, содержащей κДНК, кодирующую один из вариантов PH20 или кодирующую PH20 дикого типа, монослой клеток CHO-S (Invitrogen, Cat. No. 11619-012) трансфицировали с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668-027) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Клетки CHO-S высевали в ночь перед трансфекцией и выращивали в DMEM с 10% FBS до плотности 80% на следующий день. Затем среду у клеток CHO-S заменяли на Opti-MEM. Затем готовили смесь плазмидной ДНК и Lipofetamine (0,2 мкг ДНК и 0,5 мкл Lipofetamine). Смесь Lipofetamine/ДНК добавляли к клеткам CHO-S и инкубиро-

вали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли бессывороточную среду CD-CHO (Invitrogen, Cat. No. 10743-029). Супернатант от трансфицированных клеток собирали в различные временные точки после трансфекции, и обычно через 96 часов после трансфекции. Супернатант, содержащий вариант белка PH20 или PH20 дикого типа, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 3, хранили при -20°C . Активности в супернатантах скринировали, как описано в следующих примерах.

Пример 3. Скрининг библиотеки с помощью анализа активности гиалуронидазы для определения активных мутантов.

В этом примере супернатанты экспрессированных вариантов PH20, полученные в примере 2, подвергали скринингу с использованием анализа активности гиалуронидазы для оценки активности каждого мутанта. Кроме того, для обеспечения нормализации активности экспрессированных мутантов PH20 по отношению к PH20 дикого типа также измеряли активность секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Были определены активные и неактивные мутанты.

1. Создание субстрата биотинилированного HA (bHA).

1,2-МДа HA (Lifecore) биотинилировали для использования в качестве субстрата в анализе активности гиалуронидазы. Сначала 1,2 г 1,2 МДа HA растворяли при 4°C в 600 мл ddH₂O в течение недели в концентрации 2 мг/мл при перемешивании. Далее 645,71 мг биотингидразида растворяли в 100 мл DMSO до концентрации 25 мМ (6,458 мг/мл, 247,8 мг в 38,37 мл DMSO). Раствор биотина быстро нагревали до 37°C , пока раствор не становился прозрачным. Кроме того, 368,61 мг сульфо-NHS растворяли в 20 мл ddH₂O для получения 100× раствора (18,4 мг/мл сульфо-NHS). 30 мМ (1000×) раствор водорастворимого карбодиимида EDC получали растворением 17,63 мг EDC в 3 мл ddH₂O до концентрации 5,7513 мг/мл непосредственно перед проведением реакции.

В четыре 1000-мл стерильные колбы с крышками были добавлены следующие компоненты при комнатной температуре (RT) и в следующем порядке при перемешивании: 1) 200 мл 2 мг/мл раствора HA; 2) 80 мл 0,5 М MES, pH 5,0, при осторожном перемешивании; и 3) 91,6 мл ddH₂O при осторожном перемешивании. Далее были добавлены последовательно 24 мл 25 мМ биотингидразида и 4 мл 100× раствора сульфо-NHS, к которым сразу же было добавлено 500 мкл EDC. После добавления каждого компонента раствор перемешивали трёхкратным переворачиванием и встряхиванием. После добавления последнего компонента раствор перемешивали встряхиванием в течение ночи при 4°C . Затем добавляли гидрохлорид гуанидина до конечной концентрации 4 М путём добавления 38,2 г на 100 мл, его полностью растворяли, а затем объём раствора доводили до 600 мл добавлением ddH₂O.

Для диализа 200 мл из каждой партии раствора конъюгированного HA в гидрохлориде гуанидина переносили в диализные мембраны. В течение трех дней раствор подвергали диализу против ddH₂O с заменой ddH₂O, по меньшей мере, шесть раз. Полученный объём около 840 мл доводили до конечного объёма 1000 мл добавлением ddH₂O. Конечная концентрация биотинилированного гиалуронана (bHA) составила 0,4 мг/мл.

2. Анализ активности гиалуронидазы.

Анализ фермента представлял собой модификацию способа, описанного Frost et al. (1997) (A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents. Analytical Biochemistry (1997) 251:263-269), который обеспечивает определение активности гиалуронидазы PH20.

Во-первых, субстрат биотинилированный HA (bHA) связывали с пластиковыми микротитрационными планшетами для получения аналитических планшетов. Коротко, 100 мкл bHA при концентрации 1 мг/мл в 0,5 М карбонатном буфере (pH 9,6) вносили в каждую лунку микропланшета с высоким связыванием (Immunolon 4 HBX extra high binding; Thermo Scientific). Планшет герметично закрывали и хранили при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 ч.

Затем аналитический планшет промывали 1× фосфатно-солевым промывочным буфером (PBS), содержащим 0,05% (объем/объем) Tween 20 (PBST). PBST получали из 1× PBS (номер по каталогу P5368, Sigma (10 мМ фосфатный буфер, 2,7 мМ хлорид калия, 137 мМ хлорид натрия, pH 7,4), содержимое одного пакета PBS помещали в литровый мерный цилиндр в 800 мл деионизированной воды, растворяли перемешиванием или встряхиванием и добавляли достаточное количество воды до 1 л), добавляя 500 мкл Tween 20 (номер по каталогу 6505; EMD Bioscience) в 900 мл 1× PBS и добавляя достаточное количество 1× PBS до 1 л. Промывку осуществляли с помощью устройства для промывки планшетов BioTek ELx405 Select CW (BioTek) путем промывания пять раз по 300 мкл промывочного буфера PBST на лунку в каждое промывание. В конце каждой промывки планшет помещали на бумажное полотенце, чтобы удалить лишнюю жидкость из каждой лунки. Перед инкубацией с образцами добавляли 200 мкл блокирующего буфера (1,0% вес/объем бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS) в каждую лунку и предварительно инкубировали аналитический планшет при 37°C в течение приблизительно 1 ч. Блокирующий буфер получали путем добавления 2,5 г BSA (номер по каталогу 001-000-162; Jackson Immuno Research) в 200 мл 1× PBS, перемешивания, добавления достаточного количества 1× PBS до 250 мл и фильтрования через 0,2 мкм фильтровальный блок PES.

Супернатанты трансфицированных вариантов PH20 или PH20 дикого типа, полученные, как описа-

но в примере 1, разводили 1:25 в двух повторностях в аналитическом буферном растворе (pH 7,4 HEPES буфер; 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 мг/мл BSA, pH 7,4, 0,05% Tween-20) в непокрытых микропланшетах высокого связывания 4XHB. Для построения стандартной кривой в аналитическом буферном растворе в двух повторностях делали серийные разведения гHuPH20 1:3 (получен, как описано в примере 1, с удельной активностью 145 Ед/мл), начиная с 3 Ед/мл, следующим образом: 3 Ед/мл, 1 Ед/мл, 1/3 Ед/мл, 1/9 Ед/мл, 1/27 Ед/мл, 1/81 Ед/мл и 1/243 Ед/мл. 100 мкл из каждого стандарта и образца переносили в аналитические планшеты и инкубировали в течение приблизительно 1,5 ч при 37°C.

После инкубации планшет промывали PBST с помощью устройства для промывки планшетов BioTek ELx405 Select CW (BioTek) путём промывания пять раз по 300 мкл промывочного буфера PBST на лунку для каждого промывания. В конце каждой промывки планшет помещали на бумажное полотенце, чтобы удалить лишнюю жидкость из каждой лунки. Затем в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл разбавленного 1:5000 стрептавидина-HRP (SA-HRP) и инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 1 ч. Для разбавления исходный раствор конъюгата стрептавидина-HRP с концентрацией 1 мг/мл (номер по каталогу 21126; Thermo Scientific) разбавляли 1:5000 в буфере для разбавления (1 мг/мл BSA, 0,025% Tween 20, 137 mM NaCl, 20 mM трис pH 7,5). После инкубации планшет промывали PBST с помощью устройства для промывки планшетов BioTek ELx405 Select CW (BioTek) путём промывания пять раз по 300 мкл промывочного буфера PBST на лунку для каждого промывания. В конце каждой промывки планшет помещали на бумажное полотенце, чтобы удалить лишнюю жидкость из каждой лунки. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора TMB (номер по каталогу 52-00-03, KPL, при комнатной температуре и в защищенном от света месте) примерно на 5 мин при комнатной температуре или до развития оптимальной окраски. Чтобы остановить реакцию, в каждую лунку добавляли 100 мкл 1,0н. серной кислоты или стоп-раствора TMB (номер по каталогу 50-85-06), и планшеты закрывали для перемешивания. Оптическую плотность измеряли при 450 нм в течение 30 мин после добавления стоп-раствора. Так как большее количество PH20 в стандарте или образце приводит к меньшему количеству bHA, доступного для связывания SA-HRP, значение оптической плотности (450 нм) было обратно пропорционально концентрации активности гиалуронидазы в каждом образце.

3. Активность SEAP.

Активность секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP) в супернатанте клеточной культуры также была измерена с помощью колориметрического анализа плацентарной щелочной фосфатазы с использованием субстрата фосфатазы pNPP (Anaspec SensoLyte pNPP SEAP kit; Номер по каталогу 72144, Anaspec) в соответствии с инструкциями изготовителя. Сигнал оптической плотности измеряли по оптической плотности (OD) при 405 нм.

Критерии для высокопроизводительного (HTP) скрининга представляли собой сигнал SEAP трансфицированного супернатанта $\geq 0,1$ и сигнал контроля гHuPH20 дикого типа ≥ 1 Ед/мл. Кроме того, для каждого скрининга использовали следующие критерии: стандартные кривые имели отношение сигнала к шуму (S/N) для 0 Ед/мл стандарта против 3 Ед/мл стандарта при OD₄₀₅ ≥ 5 , стандартные кривые включали меньше чем три стандарта с коэффициентом вариации (CV) $\geq 10\%$, и в стандартных кривых не менее четырех стандартов находились в линейном диапазоне.

Пример 4. Выбранные варианты PH20 с измененной активностью гиалуронидазы.

Каждый созданный вариант был проскринирован на активность гиалуронидазы, как описано в примере 3. Экспрессию SEAP использовали для нормализации активности PH20 каждого варианта к PH20 дикого типа. Были определены мутанты, которые проявляют измененную активностью гиалуронидазы по сравнению с диким типом.

1. Активные мутанты.

Активные мутанты были выбраны в том случае, если по меньшей мере один образец из двух проявлял более 40% от активности дикого типа при нормировании на активность SEAP. Идентифицированные активные мутанты представлены в табл. 9. В таблице представлены аминокислотные замены по сравнению с последовательностью аминокислот PH20, приведенной в SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность примеров мутантов также приведена с указанием SEQ ID NO. Таблица также устанавливает среднюю активность гиалуронидазы в повторностях, нормализованную по значениям SEAP, по сравнению со средними активностями PH20 дикого типа в каждом планшете, которые также были нормализованы по их собственным значениям SEAP. Например, значение 0,40 указывает на то, что вариант демонстрирует 40% от активности гиалуронидазы дикого типа PH20, значение 1 указывает, что вариант демонстрирует аналогичную активность гиалуронидазы дикого типа, и значение 3,00 указывает на то, что вариант демонстрирует 300% активности гиалуронидазы дикого типа PH20 или 3-кратное увеличение активности по сравнению с диким типом.

Результаты в табл. 9 показывают, что более 600 испытанных мутантов проявляют активность, которая увеличилась по сравнению с диким типом. Например, около 536 мутантов обладают 120% или больше чем 120% от активности гиалуронидазы дикого типа PH20, и около 75 мутантов обладают 300% или больше чем 300% от активности гиалуронидазы дикого типа PH20. В частности, результаты, приведенные в табл. 9, показывают, что активность мутанта S69A гиалуронидазы при сравнении с диким типом

является 22-кратной; мутанта S69R - является примерно 14-кратной; мутанта I70A - является примерно 27-кратной; мутанта I70K - является примерно 14-кратной; мутанта I70R - является примерно 14-кратной; и мутанта I271L - является примерно 10-кратной.

Таблица 9

Активные мутанты

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
L001A	74	0,95	Q140G		0,73	T293F	561	1,94
L001C		0,89	Q140H		0,84	T293G		1,00
L001E	75	0,55	Q140I		0,75	T293K	562	1,35
L001F		0,41	Q140K	343	0,93	T293L		1,00
L001G	76	0,62	Q140L		0,51	T293M	563	2,29
L001H	73	1,90	Q140M		0,80	T293P	564	1,64
L001K	77	1,39	Q140R		0,85	T293Q	565	1,83
L001N		0,87	Q140V		0,61	T293S		0,89
L001P		0,92	Q140W		0,59	T293V	566	2,15
L001Q	78	3,27	Q140Y		0,41	T293Y	567	1,49
L001R	79	0,72	N141A		1,12	V294M		0,41
L001S		0,74	N141D		1,09	A298G	568	0,43
L001T		0,99	N141E		0,67	A298I		0,41
L001V		1,00	N141F		0,81	G300R		0,42
L001W		0,88	N141G		1,15	I301A		0,88
N002A		0,61	N141H	344	2,03	I301V		0,88
N002C		0,4	N002I		0,37	V287N		0,35
G291C		0,27	G297A		0,57	V302W		0,46
N002G		0,44	N141L		0,61	V302I		0,45
N002L		0,46	N141M		0,48	I303V		0,47
N002P		0,54	N141Q		1,16	W304G		1,13
N002Q		0,84	N141R	345	1,40	W304I		1,17
N002S		0,78	N141S	346	0,72	G305D		1,00
N002T		1,05	N141T		0,45	G305E	569	1,62
N002V		0,65	N141V		0,50	T306D		0,76
F003E		0,42	N141W	347	0,83	T306E		0,52
F003H		0,68	N141Y	348	1,55	T306S		1,02
F003L		0,59	V142C		0,61	L307K		0,43
F003Y		0,50	V142D	349	0,71	L307N		0,76
R004A		0,73	V142E		0,87	L307Q		0,61
R004I		0,54	V142G	350	0,98	L307S		0,86
R004S		0,60	V142H		1,11	L307T		1,08
R004T		0,66	V142I		0,81	L307V		0,48
R004V		1,09	V142K	351	1,40	L307W		0,64
A005H		0,44	V142L		0,75	L307Y		0,60
P006A	80	0,78	V142M		0,76	S308D	571	0,92
P006H		0,58	V142N	352	0,98	S308G	572	1,73
P006K		0,80	V142P	353	0,88	S308H		1,15
P006L		0,76	V142Q	354	1,04	S308K	573	1,33
P006N		0,40	V142R	355	1,53	S308N	574	2,33
P006Q		0,89	V142S	356	0,93	S308P		0,65
P006R		0,56	V142T	357	1,19	S308R	575	1,34
P007M		0,57	Q143E		0,77	S308T		0,72

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
V008I		1,17	Q143G	358	0,62	I309D		0,72
V008L		0,53	Q143I		0,44	I309E	576	1,99
V008M	81	0,47	Q143K	359	1,30	I309G	577	1,44
V008P		0,33	I009Q		0,4	I303D		0,34
I009K		0,69	Q143L		0,56	I309H	578	1,30
I009L		1,08	Q143N		0,73	I309K		0,98
I009R		0,53	Q143V		0,57	I309L	579	1,72
I009S		0,98	L144T	361	1,02	I309M	580	1,47
I009V		0,84	L144W		0,79	I309N	581	3,11
P010D		0,62	S145A		0,58	I309Q	582	1,64
P010E		0,66	S145C		0,44	I309R	583	2,27
P010G	83	0,55	S145D		0,48	I309S	584	1,16
P010H	84	0,43	S145E		0,56	I309T	585	2,09
P010N		0,55	S145G		0,94	I309V	586	0,60
P010Q		0,89	S145H		0,56	I309W		0,88
P010R		0,73	S145L		0,44	M310A	587	1,50
P010S		0,55	S145M		0,56	M310G	588	2,73
P010W		0,59	S145N		0,58	M310Q	589	0,59
N011D		0,54	S145P		1,04	M310R		0,50
N011G		0,45	S145R		0,97	M310S	590	1,61
N011H		0,69	L146A		0,52	M310V		0,70
N011K		0,58	L146C		0,42	R311G		0,53
N011S	85	0,39	G305N		0,36	L307G	570	0,32
M310F		0,30	M310Y		0,38	R311G		0,54
V012A		0,56	L146E		0,50	R311H		0,48
V012E	86	1,86	L146G		0,62	R311K		0,72
V012I	87	0,68	L146H		0,78	R311Q		0,43
V012K	88	0,65	L146I		0,82	R311S		0,84
V012L		0,44	L146K		0,84	R311T		0,52
V012N		0,46	L146N		0,57	S312G		0,49
V012R		0,50	L146P	362	0,93	S312N		1,26
V012S		0,75	L146Q		0,84	S312T		0,75
V012T	89	1,50	L146R	363	1,47	M313A	591	1,34
P013H		0,46	L146S		0,71	M313E		0,63
P013S		0,68	L146T		0,74	M313G	592	0,56
P013T		0,90	L146V		0,84	M313H	593	1,23
P013Y		0,51	L146Y		0,80	M313K	594	2,85
F014D		0,64	S312K		0,38	S312L		0,38
F014I		0,42	T147A	364	1,20	M313L		1,05
F014M		0,47	T147C		0,47	M313P	595	1,11
F014V	90	0,46	T147D		0,71	M313R	596	2,30
L015A		0,65	T147F	365	1,24	M313S		0,88
L015M	92	0,45	T147G		1,05	M313T	597	0,67
L015V	91	2,20	T147I		0,85	M313V		0,99

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
A020S	93	0,50	T147L	366	1,30	M313Y	598	1,12
S022H		0,57	T147M		0,79	K314A		0,82
S022M		0,49	T147P		1,09	K314D		0,53
S022T	94	0,48	T147Q		1,29	K314H		1,10
S022Y		0,45	T147R	367	2,11	K314I		0,54
E023D		0,97	T147S	368	1,27	K314N		0,57
F024A		0,69	T147V	369	2,04	K314Q		0,62
F024E	95	3,99	T147W		0,97	K314R		0,95
F024G		0,75	T147Y		1,04	K314S	599	0,61
F024H	96	2,07	E148C		0,66	K314T		0,61
F024I		0,70	E148F		0,42	K314Y	600	0,45
F024K		0,96	E148G		1,05	S315A	601	0,85
F024L		0,62	E148H	370	1,24	S315E		0,41
F024M		0,85	E148I		0,73	S315G		0,72
F024N		0,60	E148K	371	1,63	S315H	602	2,04
F024R	97	1,22	E148L		0,85	S315K		0,62
F024T		1,18	E148Q	372	1,44	S315L		0,42
F024V		1,15	E148R		0,97	S315M		0,63
F024Y		0,90	E148S		1,15	S315R		1,04
L026A	98	1,30	E148T		0,82	S315T		0,97
L026E	99	3,22	E148V		0,99	S315Y	603	0,50
L026G		0,81	E148W		0,43	C316D		0,41
L026H		0,97	E148Y		0,95	L317A	604	1,27
L026I		0,51	A149C		1,15	L317D		0,61
L026K	100	1,88	A149G		0,52	L317H		1,05
L026M	101	1,43	A149K		0,51	L317I	605	1,76
L026P		0,55	A149L		0,88	L317K	606	5,11
L026Q	102	1,44	A149M		0,88	L317M		1,20
L026R	103	1,43	A149Q		1,15	L317N	607	0,73
L026S		0,78	A149R		1,02	L317Q	608	1,67
L026T		0,87	A149S		1,08	L317R	609	2,41
L026V		0,52	A149T	373	1,24	L317S	610	1,03
L026W		0,53	A149V	374	1,34	L317T	611	0,93
L026Y		0,52	T150A	375	1,21	L317W	612	0,84
G027A		0,79	T150C		0,70	L318D	614	0,46
G027D	104	1,22	T150D	376	1,24	L318F		0,51
G027E		1,18	T150E		1,05	L318G		0,49
G027F		0,61	T150F		0,71	L318H	615	0,45
G027H		1,11	T150G	377	2,19	L318I		0,70
G027I		0,41	T150I		0,52	L318K	616	1,36
G027K	105	2,71	T150L		0,70	L318M	613	1,68
G027L		0,76	T150N	378	0,91	L318N		0,52
G027P		0,46	T150P		0,88	L318Q		0,71
G027Q		1,12	T150R		0,90	L318R	617	1,34

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
G027R	106	1,88	T150S	379	0,92	L318S		0,71
G027S		0,94	T150W	380	1,25	L318T		0,63
G027T		0,61	T150Y	381	1,36	D320E		0,78
G027W		0,76	E151A	382	1,27	D320G		0,83
K028A		0,78	E151C		1,00	D320H	618	1,75
K028D		0,62	E151G		1,06	D320I		1,00
K028E		0,54	E151H	383	1,34	D320K	619	6,42
K028F		0,75	E151K	384	2,05	D320M		0,79
K028I		0,55	E151L	385	1,03	D320N		0,52
K028L		0,51	E151M	386	1,26	D320R	620	3,19
K028M		0,67	E151N		0,95	D320S		1,19
K028N		0,58	E151Q	387	2,01	D320W		0,40
K028P		0,40	D320L		0,37	D320V		0,35
K028R	107	0,71	E151R	388	1,61	D320Y		0,86
K028S		0,46	E151S	389	1,28	N321A		1,01
K028T		0,68	E151T	390	1,21	N321D		1,25
K028V		0,76	E151V	391	1,38	N321H		0,92
K028W		0,51	E151W	392	1,31	N321K		1,29
F029A		0,90	E151Y	393	1,31	N321R	621	1,23
F029E	108	4,03	K152A		0,51	N321S	622	1,26
F029G		1,05	K152C		0,52	N321T		0,64
F029H		0,82	K152F		0,61	N321Y		0,40
F029I	109	1,53	K152I		0,65	M323F		0,64
F029K	110	1,34	K152M		0,75	M323I		0,55
F029L	111	2,36	K152R	394	1,85	M323L		0,55
F029M	112	2,08	K152T	395	1,20	E324A		0,59
F029P	113	3,79	K152V		0,82	E324D		1,15
F029R	114	1,24	K152Y		0,67	E324H		0,79
F029S	115	2,21	A153I		0,93	E324M		0,50
F029T	116	0,85	A153L		0,51	E324N	623	1,01
F029V	117	1,65	K154R		0,86	E324R	624	2,28
F029W		0,48	K154T		0,83	E324S		0,62
D030A		1,12	K154V		0,46	T325A	625	1,87
D030F		0,84	Q155A		0,91	T325D	626	1,78
D030G	118	2,02	Q155C		0,60	T325E	627	4,03
D030H	119	1,69	Q155D	397	1,49	T325G	628	4,21
D030K	120	2,63	Q155F		0,70	T325H	629	3,45
D030L	121	1,32	Q155G	398	1,61	T325K	630	4,37
D030M	122	1,85	Q155H		1,03	T325M	631	2,11
D030P		1,19	Q155K	399	1,57	T325N	632	4,64
D030Q		0,84	Q155L		0,86	T325Q	633	5,08
D030R	123	1,82	Q155M		0,97	T325S	634	3,19
D030S	124	1,62	Q155R	400	1,27	T325V	635	1,24
D030T		0,57	Q155S		0,77	T325W		0,62

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
D030V		0,46	Q155T		0,76	I326K		0,95
D030W		0,62	Q155V		0,73	I326L	636	1,50
E031A	125	2,05	Q155W		0,91	I326V	637	6,29
E031C	126	2,95	E156A		0,79	I326Y		0,77
E031G	127	1,27	E156D	401	1,95	L327M		0,52
E031H	128	2,74	E156G		0,49	N328A		0,67
E031I	129	3,89	E156I		0,51	N328C	638	1,25
E031K	130	3,13	E156L		0,43	N328G	639	0,56
E031L	131	2,62	E156M		0,87	N328H		0,88
E031P	132	1,51	E156Q		0,84	N328I		1,85
E031R	133	2,27	E156R		0,43	N328K	640	2,12
E031S	134	1,70	E156S		0,62	N328L	641	2,01
E031T	135	3,96	E156T		0,69	N328Q		1,13
E031V	136	4,57	E156V		0,45	N328R		0,68
E031W	137	1,26	E156W		0,49	N328S	643	2,22
E031Y		1,13	F157W		0,61	N328T		0,59
P032A		0,92	E158A		0,56	N328V		1,16
P032C	138	0,40	E158F		0,51	N328Y	644	1,66
P032F	139	2,71	E158H		0,54	I331V		0,94
I326C		0,39	I326S		0,95	N328W		0,33
I331C		0,27	I331E		0,34	V334T		0,39
P032G	140	1,60	E158L		0,44	V334P		0,46
P032H	141	2,08	E158Q	402	1,25	T335S	645	0,47
P032K		1,04	E158S	403	0,95	A338Q		0,63
P032L		0,82	K159A		0,64	K339M		0,61
P032M		0,67	K159D		0,52	S342A		0,68
P032N		0,70	K159E		0,49	Q343T		0,49
P032Q		1,11	K159H		0,74	Q343V		0,51
P032R		1,17	K159L		0,62	Q347A	646	0,78
P032S		1,01	K159M		0,66	Q347E		0,78
P032T		0,77	K159N		0,73	Q347G	647	2,68
P032V		0,81	K159Q		0,92	Q347M		0,61
P032W		0,54	K159R		0,88	Q347R		0,55
P032Y		1,01	K159S		0,67	Q347S	648	2,38
L033G	143	0,57	K159V		0,41	E348D		0,67
L033M		0,69	A160C		0,61	E348G		0,55
L033P		0,87	A160F		0,79	E348S		0,44
L033Q		0,45	A160G		0,75	Q349A		0,47
L033R		0,61	A160H		0,47	Q349E		0,83
L033S		0,48	A160I		0,43	Q349K		0,93
L033T		0,45	A160K		0,91	Q349M	649	0,70
L033W	142	1,58	A160L		0,67	Q349N		0,44
D034A		0,38	M035Q		0,37	M035V		0,37
D034E		0,58	A160M		0,77	Q349R	650	0,73

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
D034H		0,41	A160N		0,56	Q349T		0,49
D034K		0,54	A160Q		0,65	V351A		1,14
D034Q		0,59	A160R		0,89	V351S	651	0,92
D034R		1,17	A160S	404	1,35	I353T		0,42
D034W	144	0,46	A160V		0,73	I353V	652	1,61
M035F		0,87	A160Y		1,07	N356A		0,41
M035H		0,60	G161A		0,99	N356D		0,79
M035L		0,52	G161C		0,44	N356H	653	0,82
M035T		0,83	G161D		0,86	N356S	654	0,46
M035Y		0,78	G161E		0,49	W357A		0,80
S036A		0,45	G161R		0,48	W357C		0,67
S036D		0,32	S036N	148	0,38	L037W		0,36
S036G		0,64	G161S		0,77	W357S		0,41
S036H	147	0,54	G161V		0,42	W357T		0,62
S036K		0,83	K162A		0,50	N358C		0,66
S036L		0,71	K162D		0,77	N358G		0,41
S036R		1,09	K162E	405	0,51	N358T		0,58
Q347L		0,39	V351C		0,35	V351I		0,36
V351Q		0,34	W357K		0,36	N358L		0,38
S036T		0,51	K162G		0,56	S359D		0,45
L037F	149	3,33	K162H		0,62	S359E	655	1,05
L037I		0,62	K162L		0,54	S359H	656	0,44
L037K		0,43	K162M		1,04	S359K		0,66
L037M	150	1,46	K162P		0,64	S359M		0,63
L037P		0,63	K162Q		0,58	S359T	657	2,11
L037R		0,51	K162R		0,52	S359V		0,65
L037V		0,57	K162S		0,47	S360T		0,50
F038Y	151	1,29	K162V		0,52	P367A	658	0,55
S039A	152	1,06	K162W		1,01	P367C		0,83
S039L	153	0,80	K162Y		0,72	P367G	659	0,47
S039N	154	2,32	D163A	406	1,52	P367K	660	0,57
S039Q		1,10	D163E	407	1,63	P367R		0,46
S039R		0,56	D163G		1,15	P367S	661	0,52
S039T	155	1,57	D163K	408	1,90	D368A	662	1,34
S039Y		0,56	D163L		1,18	D368E	663	1,28
F040L	156	0,92	D163Q	409	1,40	D368G		0,49
F040W		1,11	D163R	410	1,80	D368H		0,96
I041A		0,67	D163S	411	1,34	D368K	664	1,31
I041C		0,53	D163T		1,13	D368L	665	0,64
I041D		0,78	D163V		0,76	D368M	666	0,78
I041E		0,51	F164L		1,13	D368R	667	1,31
I041G		0,76	F164M	412	1,66	D368S		0,93
I041H		0,77	F164V	413	1,23	D368T	668	0,80
I041N		0,40	S043N		0,34	D361H		0,37

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
I041T	157	1,47	F164W		0,72	D368V		0,41
I041V		0,73	L165A		0,48	N369H	669	1,33
I041W		0,66	L165D	414	5,79	N369R	670	0,55
G042A		0,64	L165F	415	1,23	N369S		0,54
S043T		0,43	L165N	416	2,19	A371E		1,05
P044E		0,59	L165R		0,59	A371F	671	0,52
R045I		0,45	L165S	417	1,31	A371H	672	1,20
R045K		0,53	L165V	418	1,22	A371I		0,50
I046A		1,04	L165W		1,14	A371K	673	1,76
I046C		0,37	A371G		0,38	L374W		0,34
I046E		0,43	L165Y		0,66	A371L	674	0,57
I046F		0,73	V166A	419	2,85	A371M		0,57
I046H		0,82	V166C		1,16	A371R	675	1,51
I046L	158	1,08	V166E	420	1,28	A371S	676	1,45
I046M		1,00	V166F	421	1,67	A371V		0,94
I046N		0,66	V166G		1,11	Q373A		0,65
I046R	159	2,29	V166H	422	1,74	Q373E		0,81
I046S		0,64	V166L	423	4,38	Q373F		0,62
I046T		0,55	V166Q	424	3,61	Q373K		0,73
I046V		1,01	V166R	425	5,56	Q373L		0,84
I046Y		0,76	V166T	426	4,26	Q373M	677	1,43
N047A		0,48	V166W	427	1,26	Q373R		0,68
N047D	160	0,82	V166Y	428	2,08	Q373S		0,87
N047F	161	1,32	E167A		0,84	Q373V		1,05
N047G		0,82	E167D	429	0,69	L374A		0,60
N047H		1,16	E167G		0,60	L374H	678	1,42
N047K		0,67	E167H		0,89	L374I		0,80
N047M		0,77	E167K		0,91	L374M		1,11
N047Q		0,69	E167M		0,87	L374N		0,43
N047R		0,84	E167N		0,83	L374P	679	0,43
N047S		0,85	E167P		0,58	L374R		0,83
N047T	162	1,49	E167R		1,02	L374S		0,58
N047W	163	0,63	E167S		1,17	L374T		0,47
N047Y		0,45	E167T		0,59	L374V		0,56
A048F	164	2,51	E167Y		0,55	L374Y		0,66
A048G		0,83	T168H		0,46	E375A	680	0,42
A048H	165	1,99	I169L	430	2,08	E375G	681	0,90
A048I		0,64	I169R		0,54	E375K	682	1,49
A048K	166	1,28	I169V		0,74	E375L		0,46
A048M		0,76	K170N		0,72	E375M		0,54
A048N	167	4,25	K170R	431	2,58	E375N		0,81
A048Q		1,05	K170V		0,58	E375R	683	0,43
A048R		0,66	L171I		0,73	E375S		0,77
A048S		1,06	L171V		0,64	E375T		1,17

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
A048V		0,60	G172A	432	1,20	K376A		0,95
A048Y		0,81	G172C		1,03	K376D	684	0,78
T049I		0,42	K173N		0,44	K376E	685	0,88
T049K		0,85	K173R	433	0,82	K376M		0,46
T049R	168	1,41	L174A		1,20	K376Q	686	0,69
T049S		0,92	L174G	434	0,40	K376R	687	0,67
T049V		0,45	L174K	435	2,39	K376S		0,80
G050A		0,93	L174M		0,79	K376T	688	0,53
G050C		0,41	L174N	436	1,36	K376V	689	0,58
G050D	169	1,37	L174Q		0,99	K376Y	690	0,42
G050E		0,78	L174R	437	1,50	G377D	691	1,35
G050H		0,74	L174S		0,85	G377E	692	0,59
G050L		0,43	L174T	438	1,12	G377H	693	1,49
G050M	171	0,47	L174V		0,62	G377K	694	1,50
G050Q		0,86	L174W		0,78	G377P	695	2,30
G050R		0,86	L174Y		1,06	G377R	696	1,28
G050S	170	1,24	L175E		0,43	G377S	697	1,80
G050V		0,3	Q051A		0,34	Q051R		0,36
G050Y		0,58	L175H		0,57	G377T	698	3,83
Q051N		0,60	L175T	439	1,43	G378K		1,22
Q051S		0,46	L175V		0,94	G378N		0,64
G052N	172	0,89	L175Y		0,66	G378R		1,03
G052P		0,43	R176K		0,67	K379G		0,52
G052Q	173	3,71	N178G		0,85	K379H		0,57
G052R	174	0,53	N178K	440	0,85	K379R		0,74
G052S	175	1,32	N178M		0,88	K379S		0,46
E375I		0,36	K376L		0,37	K379T		0,4
F380V		0,39	F380T		0,39	M035Q	145	0,37
G052T	176	0,49	N178R	441	1,10	F380I		0,56
T054A		0,43	H179A		1,06	F380L		0,67
T054F		0,56	H179C		0,94	F380P		0,47
T054N		0,48	H179E		0,62	F380W	699	2,15
T054Q		0,91	H179G		0,86	F380Y	700	1,50
T054S		0,70	H179I		0,90	T381H		0,48
T054V		0,66	H179K	442	1,39	T381K		1,06
V058C	177	0,55	H179L		0,73	T381N		0,51
V058G		0,54	H179M		0,63	T381Q		0,84
V058H	183	1,09	H179N		0,96	T381R		0,87
V058I		0,57	H179P		0,44	T381S	701	0,87
V058K	178	4,08	H179R		0,96	T381V		0,89
V058L	179	1,54	H179S		0,51	R383A		0,51
V058N	184	0,49	H179T		0,43	R383E		0,51
V058P	180	0,90	H179V		0,42	R383H		0,71
V058Q	181	4,54	L180F		0,59	R383I	702	0,71

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
V058R	182	1,92	L180G		0,62	R383K	703	1,30
V058S		0,83	L180K		0,44	R383L	704	1,31
V058W		0,65	L180M		0,64	R383M		0,61
V058Y	185	1,07	W181M		0,88	R383N		0,77
D059Q		0,40	L061F		0,3	T381E		0,35
D059N	186	1,27	W181Q		0,88	R383S	705	0,87
R060K		0,69	G182L		0,90	R383T		0,98
L061I		0,42	Y183L		0,70	R383V		1,05
L061M		0,73	F186Y		0,59	K385A	706	1,12
L061V		0,59	H192S		0,49	K385G		0,62
Y063A		0,63	H192T		0,50	K385H		0,50
Y063H		1,07	H193G		0,68	K385N		0,41
Y063I		1,03	H193Q	443	0,82	K385Q	707	0,73
Y063K	187	1,36	H193S		0,42	K385R		0,94
Y063L	188	1,33	H193Y		0,58	K385S		1,05
Y063M	189	1,32	K195A		0,51	K385T		0,46
Y063N		0,96	K195G		0,45	K385V	708	0,43
Y063R	190	1,40	K195H		0,45	T387S		0,93
Y063S		1,00	K195I		0,50	L388F		0,92
Y063T		1,07	K195L		0,45	L388H		0,47
Y063V		0,43	K195N	445	0,74	L388I		0,98
Y063W	191	1,53	K195Q		0,71	L388M		0,79
P065R		0,57	K195R		0,85	L388R		0,60
Y066H		0,47	K195S		0,42	L388T		0,51
Y066R		0,51	K195T	444	0,58	L388V		0,78
I067F		1,00	K195W		0,49	L388W		0,77
I067L		0,45	K196E	446	0,43	L388Y		1,18
I067R		0,24	D068G		0,37	E392W		0,31
I067V	192	1,80	K196G		0,41	E389A	709	1,14
I067Y		0,55	K196L		0,65	E389G	710	0,91
D068E		0,72	K196R	447	0,58	E389H		1,17
D068H	193	2,06	K196S		0,68	E389K	712	1,91
D068K		1,08	K196T		1,18	E389L	711	0,65
D068L		0,43	K196W		0,55	E389M		0,60
D068P	194	0,50	P197A		0,81	E389P		0,75
D068Q	195	1,67	P197D		0,58	E389Q	713	0,69
D068R		0,70	P197E		0,52	E389R		0,94
D068S		0,81	P197F		0,48	E389S	714	1,08
D068T		0,75	P197G		0,75	E389T		0,70
S069A	196	22,06	P197H		0,62	E389Y		0,77
S069C	197	1,97	P197K		0,99	L391C		0,90
S069E	198	1,48	P197L		0,56	E392A	715	0,58
S069F	199	8,75	P197M		1,03	E392F	716	0,54
S069G	200	6,06	P197Q		0,69	E392G		1,00

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
S069I	201	3,12	P197R		0,58	E392K		0,66
S069L	202	3,44	P197S		0,70	E392L		0,80
S069M	203	2,67	P197T		0,41	E392M	717	1,54
S069P	204	8,14	G198A		0,80	E392Q	718	1,01
S069R	205	14,06	G198D	448	1,99	E392R	719	0,66
S069T	206	0,58	G198E		0,49	E392S		0,52
S069W	207	2,18	G198H		0,84	E392T		0,72
S069Y	208	2,71	G198L		0,48	E392V	720	1,27
I070A	209	27,00	G198N		0,80	E392Y		0,92
I070C	210	2,57	G198Q		0,55	Q393A		1,26
I070F	211	5,69	G198R		0,58	Q393D		0,45
I070G	212	6,22	G198S		0,76	Q393F	721	1,23
I070H	213	9,09	G198T		0,41	Q393H		1,05
I070K	214	14,64	G198Y		0,81	Q393K		0,80
I070L	215	3,05	N200D		0,46	Q393L		0,91
I070N	216	6,19	S202M		0,40	Q393M	722	0,80
I070P	217	3,03	F204P	449	0,63	Q393N		0,72
I070R	218	13,95	N205A	450	1,30	Q393R		0,74
I070S	219	3,63	N205D		0,85	Q393S		1,15
I070T	220	5,43	N205E	451	1,94	Q393T		0,41
I070V	221	6,34	N205F		0,52	F394L		0,56
I070Y	222	1,26	N205G		0,79	F394W		0,41
T071A		0,86	N205K		0,76	S395A	723	1,10
T071D		0,50	N205M		0,58	S395G		0,77
T071G	223	1,41	N205P		0,75	S395H	724	0,56
T071H		0,93	N205R		0,54	S395K		0,96
T071L		1,09	N205S		0,80	S395R	725	1,98
T071M		0,89	N205T	453	0,85	E396A	726	0,52
T071N	224	1,21	N205V		0,49	E396D		0,64
T071Q		0,68	N205W		0,41	E396H	727	0,47
T071R	225	2,17	V206H		0,50	E396Q	728	0,73
T071S	226	1,54	V206I	454	0,94	E396R		0,61
G072A		0,45	V206K	455	1,75	E396S	729	0,61
G072D		0,60	V206L	456	1,57	E396T		0,89
S395W		0,4	S395T		0,39	E396L		0,39
G072E		0,69	V206M		0,43	Y399A		1,01
G072H		0,46	V206R	457	1,30	Y399C		0,46
G072K	227	1,39	V206S		0,72	Y399E		1,49
G072L		0,43	G072Y		0,35	S407L		0,4
G072M	228	3,11	V206T		0,59	Y399K	730	1,94
G072Q	229	2,33	I208A		0,62	Y399M	731	2,70
G072R		0,65	I208C		0,48	Y399N		0,52
G072S		0,51	I208K		0,91	Y399Q		1,18
V073A	230	1,38	I208L		0,84	Y399R		1,20

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
V073C		0,84	I208M		0,88	Y399S		1,01
V073D		0,94	I208Q		0,77	Y399T	732	2,40
V073G		1,17	I208R		1,14	Y399V	733	1,44
V073H	231	1,54	I208S		0,62	Y399W	734	1,92
V073K	232	1,42	I208T		1,01	S401A	735	0,82
V073L	233	1,59	I208V		1,07	S401E	736	0,46
V073M		0,68	K209A		0,53	S401N		0,42
V073Q	234	0,96	K209E		0,46	Y403F		0,62
V073R	235	0,72	K209G		0,44	S404A	737	0,63
V073S		0,86	K209N		0,50	S404P		0,64
K297R		0,34	F398L		0,35	S401G		0,38
S401Q		0,39	S404T		0,37	T405F		0,36
V073T	236	1,34	K209R	458	0,68	T405A		0,56
V073W	237	1,91	K209S		0,50	T405G	738	2,32
T074A	238	2,28	K209T		0,50	T405K		0,74
T074C	239	2,18	D212N	459	1,52	T405M		0,48
T074E	240	1,38	D212S	460	0,93	T405P		0,64
T074F	241	1,43	D212T		0,76	T405Q		0,75
T074G	242	2,75	D213A	461	0,85	T405R		0,60
T074H	243	1,40	D213E		0,79	T405S		0,94
T074K	244	1,29	D213G		0,81	T405W		0,73
T074L	245	1,43	D213H		0,75	T405Y		0,44
T074M	246	0,52	D213K		0,82	L406A		0,70
T074N	247	2,12	D213L		0,56	L406C		0,98
T074P	248	2,45	D213M	462	1,56	L406E		0,73
T074R	249	2,22	D213N	463	1,53	L406F	739	1,42
T074S	250	1,80	D213Q		1,04	L406G		1,00
T074V	251	2,27	D213R		0,92	L406I		0,61
T074W	252	2,13	D213V		0,47	L406N	740	0,76
V075A		0,71	D213W		0,49	L406Q		0,93
V075C		0,46	D213Y		0,49	L406S		0,47
V075F	253	2,00	L214Q		0,57	L406T		0,83
V075H		0,62	S215A		0,74	L406V		0,87
V075L	254	5,22	S215D		0,62	L406Y		0,74
V075M	255	1,16	S215E		0,74	S407A	741	1,16
V075N		0,81	S215G		0,88	S407D	742	1,52
V075Q		1,51	S215H	464	0,91	S407E	743	1,38
V075R	256	3,02	S215K		0,99	S407F	744	1,42
V075S		0,76	S215L		0,60	S407G		0,75
V075T	257	4,34	S215M	465	1,77	S407H	745	1,34
V075Y		0,63	S215Q		0,79	S407M		0,74
G077H		0,32	G077K		0,32	K411H		0,33
I079L	258	1,44	S215R		0,71	S407N		0,72
I079T		0,79	S215T		0,80	S407P	747	0,94

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
I079V		1,01	S215V		0,69	S407Q	746	1,71
Q081P		0,60	S215W		0,52	S407R		1,04
K082A		0,94	W216Y		0,48	S407V		0,56
K082E		0,50	L217M		0,51	S407W		0,41
K082G		0,64	W218F		0,57	K409A	748	2,18
K082H		0,44	N219A	466	1,29	K409D		0,65
K082I		1,01	N219C		0,43	K409E		0,62
K082L	259	0,87	N219D		0,75	K409G		0,50
K082M		0,58	N219E		0,95	K409H		0,64
K082N	260	0,96	N219H		0,97	K409I		0,51
K082Q		0,76	N219I	467	0,60	K409P		0,48
K082R		0,85	N219K	468	1,45	K409Q	749	3,33
K082S		0,62	N219L		0,72	K409R		0,84
K082T		0,56	N219M		1,02	K409S		0,72
K082Y		0,32	I083H		0,4	I083K		0,30
K082V		0,57	N219R		1,10	K409T		0,63
I083F		0,57	N219S	469	2,48	K409V		0,48
I083G	264	1,05	N219T		0,82	A412Y		0,66
I083L		0,93	N219W		0,48	E410D		0,47
I083N		0,82	E220A		0,75	E410K		0,70
I083Q	262	1,07	E220H	470	1,40	E410M		0,42
I083R		0,45	E220I	471	1,34	E410N		0,67
I083S	263	0,79	E220L	472	1,45	E410P		0,73
I083T		0,95	E220S		0,62	E410Q		0,85
I083V	261	0,99	E220T		0,91	E410R		0,61
S084D		0,98	E220V	473	1,35	E410S		0,81
S084E	265	0,52	S221A		0,72	E410T	750	1,54
S084F	266	0,72	S221C		0,59	E410V		0,65
S084G	267	8,68	S221M		0,46	E410Y		0,62
S084H		0,96	S221Q	474	1,37	K411A		0,48
S084I		0,90	S221T		0,94	K411N		1,02
S084L		0,92	S221V		1,04	K411P		0,42
S084M		0,77	T222D		0,43	K411R		0,97
S084N	268	0,89	T222F		0,43	K411S		1,21
S084P		0,57	T222G	475	0,49	K411T		0,63
S084Q		0,86	T222K		0,75	K411V		0,99
S084R	269	1,89	T222L		0,64	A412D		0,74
S084T		0,82	T222N		0,80	A412G		0,80
S084W		0,86	T222R		0,75	A412I		0,81
S084Y		0,30	E220D		0,39	E220M		0,36
S221I		0,35	T222I		0,4	P226W		0,51
L085V		0,42	T222S		0,63	A412L		0,65
Q086A	270	2,70	T222V		0,79	A412N		0,86
Q086D		0,88	L224I		0,61	A412P		0,77

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
Q086E		1,18	L230I		0,87	A412R	752	0,66
Q086F		0,54	N231T		1,10	A412S		0,86
Q086G		1,02	T232F	476	0,73	A412V	753	0,53
Q086H	271	1,70	T232S		0,76	A412W		0,54
Q086I		0,65	Q233A		0,71	D413E		0,52
Q086K	272	0,97	Q233F		0,53	D413K		0,42
Q086L		0,92	Q233G	477	0,46	D413N		0,94
Q086M		1,06	Q233K	478	1,69	D413R		0,50
Q086N	273	1,28	Q233L		0,69	D413T		0,41
Q086P		0,42	Q233R	479	1,50	V414I		1,12
Q086R		0,93	Q233Y		0,50	V414M		0,53
Q086S	274	0,85	Q234M	480	1,65	K415G		0,40
Q086T	275	0,58	S235A	481	0,47	K415S		0,42
Q086V		0,97	S235E		1,00	K415W		0,42
Q086W	276	1,21	S235G		0,95	D416F		0,41
D087A		1,00	S235H		0,44	D416G		0,67
D087C	277	1,77	S235K		0,53	D416H		0,57
D087E		0,86	S235T		0,66	D416I		0,63
D087G	278	1,00	P236A		1,07	D416K		0,76
D087H		0,72	P236G		1,09	D416L	754	0,75
D087I		0,53	P236H		0,46	D416N		0,73
D087L	279	0,55	P236K		0,71	D416Q		0,83
D087M	280	0,58	P236R	482	3,09	D416R		0,46
D087P		0,31	Q234L		0,40	V237C	483	0,35
D087Q		1,05	P236S		0,91	D416T		0,85
D087R	281	1,28	V237A		0,90	D416V		0,59
D087S	282	0,99	V237E	484	1,93	D416Y		0,40
D087T	283	1,70	V237F		0,41	T417I		1,22
A412H		0,39	A412Q	751	0,35	D413A		0,38
D413H		0,31	A413Q		0,38	D413S		0,39
V414K		0,3	V414L		0,36	K415Y		0,39
K415V		0,39	D418G		0,45			
D087V	284	0,66	V237H	485	0,75	D418A		0,92
D087Y	285	2,72	V237L		1,12	D418E	755	1,31
L089C	286	1,46	V237N		0,67	D418F		0,81
L089R		0,34	L089W		0,26	L089P		0,38
L089K		0,45	V237Q	486	1,46	D418G		0,45
L089M		0,63	V237R		0,71	D418I		0,99
D090A	287	1,48	V237S		1,03	D418L	756	1,28
D090E	288	1,15	V237T	487	1,01	D418M		1,09
D090G		0,41	V237W		0,52	D418N		0,91
D090H	289	1,24	A238D		0,75	D418P	757	2,11
D090I		1,10	A238E	488	0,59	D418Q		1,05
D090K	290	1,36	A238H	489	0,60	D418R	758	1,18

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
D090L		1,15	A238K		0,60	D418S		0,78
D090N	291	1,18	A238Q		1,02	D418V	759	1,43
D090Q		1,11	A238R		0,49	D418Y		0,97
D090R	292	1,49	A238S	490	2,62	A419E		0,45
D090S		1,15	A238T		0,44	A419F	760	2,17
D090T		1,02	T240K		1,13	A419G		0,42
D090W		0,81	T240A	491	0,48	A419H	761	1,21
K091A		0,89	T240M		0,48	A419I	762	1,64
K091Q		0,43	T240P		0,56	A419K	763	1,88
K091R		0,67	T240Q	492	0,75	A419L		0,56
A092C	293	1,97	T240R		0,91	A419N		0,53
A092H		0,22	A239N		0,32	V421I		0,39
A092L	294	1,29	T240S		0,74	A419R	764	1,81
A092M		0,86	T240V		0,77	A419S	765	2,65
A092T		0,70	Y242F		1,08	A419W		0,69
A092V		1,09	N245H		0,50	A419Y	766	1,44
K093D		0,71	V247I	493	2,01	V420I		1,04
K093E		0,83	V247L		0,83	V420P		0,48
K093F		0,50	V247M		0,52	D421A	767	1,28
K093G		0,97	R248A	494	0,43	D421E		0,81
K093H		0,61	R248W		0,52	D421G		0,62
K093I	295	3,25	R248Y		0,67	D421H	768	1,98
R248H		0,4	I251Y		0,37	K255G		0,39
K093L	296	1,53	I251L		0,58	D421K	769	2,42
K093M		0,70	I251M		0,43	D421L		0,73
K093N		0,71	V253I		0,76	D421M		0,94
K093Q	297	0,84	K255A		0,40	D421N	770	1,89
K093R	298	1,52	K255N		0,52	D421Q	771	1,54
K093S	299	1,25	K255Q		0,91	D421R	772	2,21
K093T	300	3,93	K255R		0,71	D421S	773	2,12
K093V		0,24	K093P		0,38	K094C		0,33
K094A		0,64	K255S		0,43	D421T		0,80
K094D	301	0,93	I256A		0,42	D421Y		0,66
K094E		0,79	I256H		0,51	V422I		0,42
K094F		0,59	I256L		0,64	V422T		0,49
K094H		0,72	I256V		0,51	A425G	774	1,20
K094L		0,52	P257A		0,82	A425I		0,44
K094M		0,66	P257G	496	0,51	A425K	775	1,75
K094N		0,99	P257I		1,07	A425M		0,70
K094Q	302	1,22	P257K		0,92	A425N		0,46
K094R	303	3,94	P257L		0,69	A425R		0,49
K094S		0,94	P257M		0,90	A425S		0,47
K094T		1,14	P257N		0,69	D426E		0,62
I096D		0,69	P257Q		0,61	D426G		0,85

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
I096L		0,46	P257R	498	1,38	D426N		0,61
I096V		0,68	P257T	497	2,04	D426P		1,03
T097A	304	1,25	P257V		0,88	D426Q		0,42
T097C	305	0,53	D258H		0,84	D426Y		0,43
T097D	306	1,31	D258N	499	1,44	G427K		0,52
T097E	307	1,19	D258R		0,45	G427S		0,42
T097F		0,75	D258S	500	1,44	V428L	778	1,25
P257C		0,36	D258G		0,39	A425Y		0,39
D426K		0,26	D426S		0,36	G427T	777	0,35
G427H		0,35	G427I		0,54	G427Q	776	0,39
T097G	308	4,84	A259E		0,85	V428M		0,42
T097I		0,85	A259G		0,68	V428P		0,82
T097L	309	1,22	A259I		0,46	V428T		0,62
T097N		1,10	A259K		0,76	D431A	779	2,42
T097P		0,62	A259L		0,53	D431E	781	1,27
T097Q		1,17	A259N		0,49	D431G	780	0,55
T097R		0,95	A259P	501	1,54	D431H	782	3,13
T097S	310	1,21	A259Q		0,70	D431I		1,05
T097W		0,53	A259R		0,72	D431K	783	1,83
T097Y		0,74	A259S		0,63	D431L	784	0,62
F098A		0,60	A259T		0,51	D431N	785	1,30
F098C		0,58	A259V		0,41	D431Q	786	2,16
F098D		0,47	A259W		0,55	D431R	787	2,20
F098E		0,44	A259Y		0,51	D431S	788	1,91
F098H		1,06	K260A		0,66	D431V	789	1,52
F098I		0,52	K260D		0,41	D431W		0,56
F098L		0,58	K260E		0,58	D431Y		0,85
F098M		0,87	K260H		0,87	A432E		0,60
F098Q		0,65	K260L		0,60	A432G		0,52
P436C		0,39	E249V			A432H		0,34
F098R		0,72	K260M	502	0,85	A432N		0,51
F098S		0,56	K260Q		0,58	A432S		0,61
F098V		0,46	K260R		0,83	A432V		0,56
F098W		0,81	K260S		0,66	F433A	790	0,97
Y099A		0,33	K260G		0,37	R270T		0,40
Y099R		0,53	K260Y	503	1,73	F433C		0,69
Y099S		0,43	S261A	504	0,74	F433D		0,95
V102A		0,83	S261F		0,73	F433E		0,82
V102C		0,69	S261K	505	2,54	F433G		0,54
V102E		0,90	S261M		0,56	F433H	791	0,83
V102G		0,67	S261N	506	1,98	F433I	792	1,06
V102H		0,88	S261Q		0,76	F433K	793	1,36
V102K		1,03	S261R		1,19	F433L	794	1,87
V102L		0,71	S261T		0,66	F433P		0,95

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
V102M		0,77	S261V		0,48	F433R	795	1,63
V102N		1,02	S261W		0,44	F433S		0,86
V102Q		1,03	L263A		0,76	F433T	796	1,86
V102R		0,94	L263K	507	2,73	F433V	797	1,63
V102S	311	1,41	L263M		0,89	F433W	798	1,28
V102T	312	1,26	L263R	508	1,63	L434F		0,41
V102W		0,76	L263T		0,49	L434G		0,47
D103N		0,39	N104I		0,35	L263H		0,36
N104A		0,69	L263V		0,75	L434I		0,89
N104C		0,41	P264A		0,43	L434M		0,60
N104G		0,48	P264H		0,60	L434V		0,46
N104K		0,88	V265I		0,58	K435A		1,08
N104M		0,61	F266Y		0,58	K435C		0,53
N104R	313	1,25	A267M		0,45	K435E		0,78
N104S		1,03	A267T	509	1,34	K435G		0,64
N104T		0,71	T269A	510	1,63	K435H		1,05
L105A		0,54	T269C		0,75	K435R		1,01
L105G		0,51	T269D		0,76	K435S		1,03
L105I		0,94	T269S		1,01	K435T		0,73
L105P		0,84	R270M		0,46	K435V		0,44
L105Q		0,90	R270N		0,52	K435Y		0,50
L105R		0,65	R270S		0,69	P436D		1,19
L105S		0,61	I271F		0,72	P436E		0,74
L105T		0,51	I271G		1,29	P436G		1,19
L105W		0,34	L105C		0,33	L105H		0,36
L105V		0,99	I271L	511	10,62	P436H		0,72
G106V		0,43	V272E		0,39	V272M		0,31
M107F		0,91	I271M	512	3,24	P436I		0,84
M107I		0,67	I271S		0,42	P436K	799	2,05
M107L	314	1,32	I271V		1,05	P436L		0,63
A108G		0,47	V272D	513	1,36	P436M		0,61
I110V		0,51	V272R		0,74	P436Q		0,86
E114A	315	1,44	V272S		0,96	P436R		1,00
E114G		0,73	V272T	514	1,61	P436S		0,92
E114H		0,75	F273H	515	1,41	P436T		0,59
E114M		0,44	F273T		0,48	P436W		0,43
E114S		0,69	F273Y	516	0,90	P436Y		0,49
P117D		0,56	T274A		0,51	P437A		0,56
T118H		0,47	T274F	517	1,28	P437D		0,62
T118K		0,53	T274S		0,62	P437G		0,50
T118L		1,09	Q276C		0,88	P437H		1,11
T118M		0,53	Q276D	518	1,69	P437I	800	2,46
T118N		0,67	Q276E		1,05	P437K		0,83
T118Q	316	3,37	Q276H	519	1,20	P437L		0,51

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
T118V		0,79	Q276I		0,51	P437M	801	2,55
W119F		0,53	Q276L		0,48	P437Q		0,96
W119P		0,36	W119Q		0,72	D275L		0,24
W119Y		1,08	Q276M	520	1,14	P437R		0,85
A120D		0,76	Q276R	521	1,30	P437S		0,57
A120F	318	2,62	Q276S	522	1,63	P437Y		0,42
A120G		1,03	Q276Y	523	1,94	M438A	802	0,75
A120H	317	1,11	V277A	524	0,65	M438C		0,63
A120I	319	1,33	V277C		0,41	M438D	803	0,87
A120L		1,25	V277D		0,79	M438E	804	0,72
A120N		0,81	V277E	525	1,02	M438G		0,83
A120P		0,42	V277G		1,18	M438L	805	0,86
A120R		0,82	V277H	526	1,09	M438N	806	1,08
A120S	320	1,21	V277K	527	1,51	M438P		0,81
A120T		0,62	V277M	528	0,94	M438Q		0,85
A120V	321	1,53	V277N	529	1,15	M438R		0,99
A120W		0,59	V277Q	530	0,82	M438S		0,83
A120Y	322	1,95	V277R	531	1,63	M438T	807	3,99
N122M		0,56	V277S	532	0,83	M438V		0,85
K124L		0,34	K124H		0,35	P125A		0,36
K124R		0,62	V277T	533	1,94	M438W		0,57
P125H		0,43	V277Y		0,66	E439A	808	1,20
P125R		0,63	L278A		1,13	E439C	809	0,58
P125S		0,54	L278E	534	1,03	E439F		1,00
D127A		0,89	L278F	535	1,26	E439G		1,22
D127E	323	1,31	L278G	536	1,33	E439H		0,74
D127G		0,97	L278H	537	4,50	E439K	810	1,20
D127H	324	2,33	L278I		0,93	E439L		0,88
D127L		0,84	L278K	538	1,75	E439P	811	1,16
D127M		0,4	D275V		0,4	Q276G		0,36
D127N	325	1,69	L278N	539	1,74	E439Q	812	1,32
D127Q	326	1,21	L278R	540	5,87	E439S		1,02
D127R	327	0,51	L278S	541	1,67	E439T	813	1,15
D127S		0,77	L278T	542	1,66	E439V	814	1,57
D127T		1,11	L278V		0,44	E439W		0,62
D127V		0,56	L278Y	543	1,51	T440A		1,22
D127W		0,44	K279H	544	0,44	T440D	815	1,03
V128A		0,53	K279Q		0,84	T440E		1,00
V128C		0,68	K279R		1,10	T440F		0,85
V128G		0,49	K279T		0,86	T440G		0,86
V128I	328	1,25	F280G		0,47	T440H	816	3,00
V128K		1,16	F280Q		0,43	T440I		1,04
V128L		0,95	S282D		0,41	T440L		0,97
V128Q		0,55	S282G		0,54	T440M	817	1,08

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
V128R		0,74	S282M	545	2,64	T440P	818	0,88
V128S		0,53	S282Q		0,41	T440R	819	1,77
V128W		0,50	Q283E		0,63	T440S	820	1,17
K130I		0,50	Q283P		1,18	T440V		1,02
K130R	329	1,42	Q283R		0,59	T440Y		1,11
N131C		0,60	Q283S	546	1,73	E441A	821	1,47
N131E		0,44	Q283T		0,65	E441D		0,67
N131F		0,63	D284A		0,58	E441F	822	3,91
N131G	330	2,47	D284E		1,21	E441G		0,87
N131H		0,80	D284G		0,60	E441H		0,65
N131I	331	1,40	D284H		0,51	E441K		0,80
N131L		0,82	D284L		0,50	E441L		0,82
N131M	332	0,99	D284M		0,56	E441N		0,82
N131Q	333	1,24	D284N		0,40	E441Q		0,81
N131R	334	2,81	D284Q		0,95	E441S		0,79
N131S		0,76	D284S		0,99	E441T		0,66
N131T		1,02	E285F		0,47	E441V		0,54
N131V	335	2,08	E285G		0,52	E441Y		0,51
N131Y		0,85	E285H	547	1,30	E442C	823	1,38
R132A		0,68	E285M		0,43	E442G	824	0,51
R132C		0,58	E285N		0,40	E442H		0,76
R132E		0,70	E285Q		0,59	E442K		0,73
R132F		0,60	E285Y		0,99	E442P		0,91
R132H		0,66	L286S		0,46	E442Q		0,74
K279A		0,27	D284T		0,39	D284Y		0,37
E285A		0,34	L286R		0,53	L286W		0,38
R132I		0,56	V287I		0,51	E442R	825	3,94
R132K		1,05	V287T	548	0,50	E442T		0,61
R132L	337	0,76	Y288L		0,79	E442V		0,65
R132N	336	1,28	Y288W		0,49	E442Y		0,60
R132Q		0,69	T289K		0,75	P443A	826	1,63
R132S		0,79	T289S	549	0,48	P443E	827	1,07
R132T		0,61	F290I		0,41	P443F	828	0,70
R132V		0,73	F290M		1,03	P443G	829	1,12
R132Y		0,78	G291Q		0,80	P443H		1,08
S133I		0,54	G291R		0,45	P443L		1,19
I134L		1,04	G291S	550	0,41	P443M	830	1,99
I134T		0,60	G291V	551	1,63	P443N	831	1,25
I134V		1,08	E292A		0,66	P443Q		0,96
E135A		0,99	E292C	552	0,71	P443R		1,04
E135C		0,77	E292F	553	0,90	P443S		0,99
E135D	338	2,68	E292G		0,41	P443T		0,87
E135F		0,73	E292H	554	1,26	P443W		0,64
E442L		0,4	E442W		0,38	Q444M		0,37

Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
E135G	339	2,79	E292K	555	1,27	Q444D		0,97
E135H		0,79	E292N		0,99	Q444E	832	1,19
E135K		1,15	E292P		1,05	Q444F		0,66
E135L		0,82	E292R	556	0,42	Q444G		0,93
E135N		0,56	E292V	557	1,28	Q444H	833	0,97
E135Q		1,59	E292W		0,83	Q444I		0,58
E135R	340	2,08	T293A	558	1,90	Q444K		1,03
E135S		1,13	T293C	559	1,67	Q444N		1,01
E135W		0,63	T293D	560	1,46	Q444R		0,85
E135Y		0,50	V137C		0,37	Q444V	834	1,12
L136A		0,73	V137S		0,36	Q444W		0,64
L136C		0,56	V137L		0,21	Q444Y		0,67
L136D		0,47	Q143C		0,28	I445A		0,97
L136F		0,96	L144R	360	0,26	I445G		0,98
L136H		1,00	K152W	396	0,37	I445H	835	1,35
L136I		0,65	A153S		0,34	I445L		1,06
L136M		1,05	K154I		0,38	I445M	836	1,57
L136N		0,48	E156C		0,35	I445N	837	1,24
L136Q		0,61	E158G		0,37	I445P	838	1,67
L136R		0,74	K159G		0,38	I445Q	839	1,26
L136S		0,80	A160W		0,39	I445R		1,08
L136T		0,72	G161V		0,42	I445S	840	1,21
L136W		1,11	D163W		0,38	I445T	841	1,38
V137A		0,48	D163F		0,39	I445V	842	1,25
V137I		1,01	L165C		0,27	I445W	843	0,69
V137T		0,51	V166N		0,47	I445Y		0,53
Q138A		0,69	E167F		0,31	F446A	844	1,58
Q138C		0,65	K170A		0,40	F446C		0,75
Q138H		0,71	K170Q		0,40	F446D		1,18
Q138I		0,54	K173Q		0,32	F446E		1,10
Q138L	341	0,59	L174H		0,38	F446G		1,12
Q138M		0,68	R176L		0,40	F446H		1,28
Q138N		0,61	P177V		0,36	F446I		1,06
Q138R		0,53	L180I		0,38	F446K		0,94
Q138S		0,48	W181K		0,29	F446L		0,93
Q138W		0,41	Y183E		0,32	F446M	845	1,31
Q138Y		0,60	Y184W		0,39	F446Q		0,72
Q139A		0,92	H193R		0,33	F446R		0,89
Q139C		0,44	H193F		0,38	F446T		0,89
Q139D		0,48	K195V		0,36	F446V		0,91
Q139E		0,94	K196N		0,39	F446W	846	1,40
Q139F		0,53	K196Y		0,39	Y447D	847	3,25
Q139G		0,65	P197W		0,39	Y447E	848	1,36
Q139H		0,56	G198W		0,29	Y447F		1,41
Мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность	мутант	SEQ ID NO	Средняя нормированная активность
Q139K		0,73	N200T		0,37	Y447G	849	0,92
Q139L		0,70	F204W		0,39	Y447I	850	1,36
Q139M		0,95	N205L	452	0,39	Y447L		1,09
Q139R		0,79	N205Y		0,4	Y447M		0,90
Q139S		0,81	V206Q		0,33	Y447N	851	1,58
Q139T	342	1,31	K209F		0,4	Y447P	852	1,46
Q139V		0,77	K209L		0,38	Y447Q	853	2,37
Q140A		0,96	N211L		0,41	Y447R		1,12
Q140C		0,50	N211W		0,51	Y447T	854	1,90
Q140D		0,59	W218M		0,38	Y447V	855	1,38
Q140F		0,66	W218V		0,28	Y447W		1,07

2. Неактивные мутанты.

Другие мутанты, которые проявили менее 20% активности гиалуронидазы PH20 дикого типа по

меньшей мере в одной из повторностей, повторно скринировали, чтобы подтвердить, что указанные мутанты являются неактивными. Чтобы подтвердить отсутствие активности мутантов, анализ активности гиалуронидазы, описанный в примере 3, модифицировали, включая этап ночной инкубации при 37°C субстрата с образцом перед измерением ферментативной активности. Модифицированный тест предназначен для обнаружения активности РН20 ниже 0,2 Ед/мл.

Подготовка планшетов, покрытых бНА, и блокирование планшетов перед добавлением супернатантов трансфицированных вариантов РН20 или РН20 дикого типа проводили так же, как описано в примере 3. Анализ был модифицирован следующим образом. Во-первых, супернатанты трансфицированных вариантов РН20 или РН20 дикого типа, не содержащего мутации, полученные, как описано в примере 2, разводили 1:25 в двух повторностях в аналитическом разбавителе. Для построения стандартной кривой в разбавителе для анализа в двух повторностях получали 1:3 серийные разведения гНиРН20 (получена, как описано в примере 1), начиная с 0,1 Ед/мл и проводя разведение до 0,00014 Ед/мл. Пустая лунка также была включена в анализ. Затем в предварительно определённые лунки покрытого бНА и блокированного планшетов добавляли 100 мкл разбавленных проб или стандарта и инкубировали при 37°C в течение ночи. После инкубации планшеты промывали и детектировали связавшийся бНА, как описано выше в примере 3. Оптическую плотность измеряли при 450 нм в течение 30 мин после добавления стоп-раствора.

Идентифицированные подтвержденные неактивные мутанты приведены в табл. 10. В таблице представлены аминокислотные замены по сравнению с последовательностью аминокислот РН20, приведенной в SEQ ID NO: 3.

Таблица 10

Неактивные мутанты

N002H	R060V	R121W	C189P	P236I	V287N	L336W	G377V
N002K	R060Y	R121Y	C189R	P236L	V287P	L336Y	G378D
N002W	L061A	N122A	C189S	P236N	V287Q	A337C	G378E
N002Y	L061E	N122C	C189T	P236Q	V287R	A337F	G378F
F003A	L061F	N122E	C189V	P236T	V287S	A337G	G378I
F003G	L061G	N122F	C189W	P236Y	Y288D	A337I	G378L
F003K	L061H	N122I	C189Y	A238F	Y288E	A337K	G378M
F003P	L061N	N122K	Y190C	A238G	Y288F	A337L	G378Q
F003T	L061P	N122Q	Y190E	A238L	Y288G	A337M	G378T
F003V	L061Q	N122R	Y190F	A238P	Y288H	A337R	G378W
R004D	L061R	N122S	Y190G	A238V	Y288I	A337T	G378Y
R004E	L061T	N122T	Y190H	A238W	Y288K	A337W	K379A
R004F	L061W	N122V	Y190K	A238Y	Y288P	A338C	K379C
R004G	L061Y	W123A	Y190L	A239C	Y288R	A338D	K379E
R004L	G062A	W123C	Y190N	A239F	Y288T	A338E	K379F
R004P	G062C	W123D	Y190Q	A239G	T289A	A338F	K379I
R004W	G062D	W123E	Y190R	A239H	T289C	A338G	K379L
R004Y	G062F	W123H	Y190S	A239I	T289E	A338H	K379M
A005D	G062I	W123L	Y190T	A239L	T289G	A338I	K379W
A005G	G062K	W123M	Y190V	A239P	T289H	A338K	F380C
A005I	G062L	W123P	Y190W	A239R	T289L	A338L	F380D
A005L	G062M	W123Q	N191A	A239S	T289P	A338P	F380E
A005M	G062P	W123R	N191E	A239T	T289Q	A338R	F380G
A005N	G062Q	W123S	N191F	A239V	T289R	A338T	F380Q
A005P	G062R	W123T	N191G	A239W	T289S	A338V	F380R
A005Q	G062S	W123V	N191K	A239Y	T289Y	K339D	F380S
A005R	G062T	W123Y	N191L	T240E	F290D	K339E	T381G
A005T	G062V	K124C	N191M	T240F	F290Q	K339F	T381L
A005V	G062Y	K124D	N191P	T240G	F290Y	K339G	T381P
A005W	Y063C	K124E	N191Q	T240N	G291A	K339H	T381W
A005Y	Y063G	K124F	N191R	T240W	G291C	K339L	T381Y
P006E	Y063P	K124N	N191S	T240Y	G291D	K339N	V382E
P006F	Y064A	P125C	N191T	L241A	G291E	K339P	V382G
P006T	Y064C	P125D	N191V	L241C	G291F	K339S	V382H
P006V	Y064D	P125G	N191W	L241D	G291M	K339T	V382K
P006Y	Y064E	P125L	N191Y	L241E	G291N	K339V	V382L
P007C	Y064F	P125N	H192C	L241G	G291T	K339W	V382M
P007D	Y064G	P125W	H192F	L241I	G291W	K339Y	V382N
P007F	Y064H	K126F	H192G	L241P	G291Y	M340A	V382P
P007G	Y064I	K126H	H192K	L241R	E292I	M340C	V382Q
P007H	Y064K	K126I	H192L	L241S	E292L	M340D	V382R

030252

P007I	Y064L	K126L	H192M	L241T	E292T	M340E	V382S
P007K	Y064P	K126N	H192N	L241V	T293E	M340F	V382T
P007L	Y064Q	K126P	H192P	L241W	T293N	M340G	V382W
P007Q	Y064R	K126Y	H192Q	Y242A	V294A	M340H	V382Y
P007R	Y064S	D127K	H192R	Y242C	V294E	M340K	R383G
P007S	Y064T	V128E	H192V	Y242D	V294G	M340P	R383P
P007T	Y064V	V128P	H192W	Y242G	V294H	M340R	G384C
P007W	Y064W	Y129A	H192Y	Y242I	V294K	M340S	G384F
P007Y	P065A	Y129C	H193A	Y242L	V294L	M340T	G384M
V008D	P065C	Y129D	H193D	Y242M	V294N	M340V	G384Q
V008E	P065D	Y129E	H193K	Y242P	V294P	M340W	G384S
V008G	P065G	Y129G	H193L	Y242R	V294Q	C341A	G384T
V008H	P065H	Y129H	H193M	Y242S	V294R	C341E	K385C
V008N	P065I	Y129L	H193P	Y242T	V294S	C341G	K385L
V008R	P065K	Y129P	H193V	Y242V	V294T	C341H	K385M
V008S	P065N	Y129Q	Y194A	Y242W	V294W	C341K	K385P
V008W	P065R	Y129S	Y194C	V243C	A295C	C341L	K385W
I009C	P065S	Y129T	Y194I	V243D	A295G	C341M	K385Y
I009D	P065T	Y129V	Y194L	V243F	A295H	C341N	P386A
I009E	P065V	Y129W	Y194P	V243G	A295I	C341Q	P386C
I009G	P065W	K130C	Y194S	V243H	A295L	C341R	P386F
I009N	P065Y	K130D	Y194T	V243L	A295N	C341S	P386G
I009P	Y066A	K130G	Y194V	V243M	A295P	C341T	P386H
P010F	Y066C	K130H	K195S	V243P	A295T	C341V	P386I
P010I	Y066D	K130L	P197C	V243Q	A295V	C341Y	P386L
P010L	Y066E	K130N	G198V	V243R	A295Y	S342D	P386M
P010M	Y066G	K130S	G198W	V243S	L296C	S342E	P386N
P010Y	Y066I	K130T	Y199E	V243W	L296F	S342F	P386Q
N011A	Y066K	K130W	Y199G	V243Y	L296G	S342H	P386R
N011C	Y066L	K130Y	Y199H	R244A	L296I	S342K	P386S
N011F	Y066N	N131P	Y199I	R244D	L296K	S342L	P386T
N011I	Y066P	R132P	Y199K	R244G	L296M	S342M	P386V
N011L	Y066S	S133D	Y199L	R244I	L296Q	S342P	P386Y
N011P	Y066T	S133E	Y199P	R244V	L296R	S342Q	T387C
N011T	Y066V	S133F	Y199R	R244Y	L296S	S342R	T387E
N011W	I067D	S133G	Y199S	N245A	L296T	S342T	T387F
N011Y	I067E	S133H	Y199W	N245C	L296V	S342Y	T387G
V012G	I067G	S133L	N200A	N245F	L296W	Q343C	T387H
V012H	I067P	S133M	N200F	N245L	L296Y	Q343D	T387I
V012W	I067R	S133N	N200G	N245P	G297C	Q343F	T387L
P013E	I067T	S133P	N200H	N245Q	G297E	Q343I	T387M
P013G	I067W	S133R	N200K	N245R	G297H	Q343P	T387N
P013I	D068A	S133T	N200L	N245S	G297L	Q343W	T387V
P013L	D068C	S133V	N200M	N245T	G297N	V344F	T387W
P013M	D068G	S133W	N200P	N245V	G297P	V344G	T387Y
P013V	D068I	I134A	N200Q	R246A	G297Q	V344H	L388C

030252

F014A	D068L	I134C	N200R	R246C	G297R	V344L	L388G
F014E	D068P	I134D	N200S	R246D	G297S	V344M	L388P
F014G	D068V	I134F	N200W	R246E	G297T	V344N	L388Q
F014H	D068Y	I134G	N200Y	R246G	G297Y	V344P	L388S
F014K	S069N	I134H	G201A	R246H	A298C	V344Q	E389F
F014N	S069T	I134K	G201F	R246I	A298E	V344R	E389V
F014P	I070Q	I134P	G201L	R246K	A298L	V344S	D390A
F014Q	T071P	I134Q	G201M	R246L	A298M	V344T	D390C
F014W	G072C	I134R	G201N	R246M	A298N	V344W	D390E
L015E	G072F	I134S	G201P	R246P	A298P	V344Y	D390F
L015F	G072H	I134W	G201R	R246S	A298Q	L345A	D390G
L015G	G072I	E135P	G201S	R246T	A298S	L345C	D390H
L015K	G072P	L136P	G201T	R246V	A298T	L345E	D390L
L015N	G072V	V137F	G201V	R246W	A298W	L345H	D390N
L015P	G072W	V137G	G201W	V247A	A298Y	L345K	D390P
L015Q	V073P	V137H	S202A	V247C	S299A	L345N	D390R
L015R	V075D	V137N	S202E	V247F	S299C	L345Q	D390S
L015S	V075G	V137P	S202F	V247H	S299D	L345R	D390T
L015Y	V075P	V137R	S202G	V247N	S299F	L345T	D390V
W016A	N076A	V137W	S202H	V247P	S299G	L345V	D390W
W016C	N076C	V137Y	S202K	V247Q	S299H	L345Y	D390Y
W016D	N076F	Q138V	S202N	V247R	S299L	C346A	L391A
W016E	N076G	Q139P	S202P	V247S	S299M	C346D	L391D
W016F	N076I	Q143C	S202Q	V247T	S299P	C346F	L391G
W016G	N076K	Q143H	S202R	V247W	S299Q	C346G	L391H
W016H	N076L	Q143P	S202V	V247Y	S299T	C346I	L391K
W016K	N076P	Q143R	S202W	R248C	G300A	C346K	L391N
W016M	N076Q	Q143S	S202Y	R248D	G300C	C346L	L391P
W016P	N076R	Q143T	C203A	R248E	G300D	C346M	L391Q
W016R	N076S	L144A	C203D	R248G	G300E	C346P	L391R
W016S	N076T	L144E	C203E	R248I	G300F	C346R	L391S
W016T	N076V	L144F	C203G	R248M	G300L	C346S	L391T
W016Y	N076W	L144I	C203H	R248P	G300M	C346T	L391V
A017D	G077D	L144K	C203L	R248T	G300N	C346V	L391W
A017E	G077E	L144P	C203M	E249A	G300P	C346W	L391Y
A017G	G077L	L144Q	C203N	E249G	G300Q	Q347C	E392C
A017H	G077P	L144S	C203Q	E249H	G300S	Q347F	E392P
A017I	G077Q	L144V	C203R	E249I	G300T	Q347I	Q393C
A017L	G077R	L144Y	C203S	E249K	G300V	Q347P	Q393P
A017N	G077T	S145T	C203T	E249M	G300W	Q347T	F394A
A017P	G077V	S145W	C203V	E249Q	I301E	Q347V	F394D
A017Q	G078A	A149E	F204A	E249S	I301G	Q347W	F394E
A017R	G078D	A149P	F204C	E249Y	I301H	E348C	F394G
A017S	G078I	T150V	F204E	A250C	I301K	E348H	F394I
A017T	G078M	K152L	F204G	A250F	I301M	E348I	F394K
A017V	G078P	A153E	F204H	A250G	I301N	E348L	F394N

030252

A017W	G078T	A153F	F204I	A250H	I301P	E348P	F394P
A017Y	G078Y	A153M	F204K	A250K	I301Q	E348Q	F394Q
W018C	I079A	A153P	F204Q	A250L	I301R	E348R	F394R
W018D	I079D	A153R	F204R	A250M	I301S	E348T	F394S
W018F	I079F	A153T	F204S	A250N	I301W	E348V	F394T
W018G	I079G	A153V	F204T	A250P	I301Y	E348W	F394V
W018H	I079H	K154D	V206C	A250Q	V302C	E348Y	S395C
W018I	I079K	K154E	V206D	A250R	V302D	Q349D	S395L
W018L	I079N	K154G	V206F	A250S	V302E	Q349F	S395M
W018M	I079P	K154P	V206G	A250T	V302F	Q349G	S395P
W018P	I079S	K154S	V206P	A250V	V302G	Q349P	E396C
W018Q	I079W	K154W	V206Y	A250W	V302H	Q349V	E396F
W018S	I079Y	K154Y	E207A	I251D	V302L	Q349W	E396G
W018T	P080A	Q155P	E207F	I251F	V302M	Q349Y	E396I
W018V	P080D	Q155Y	E207G	I251G	V302P	G350A	E396P
W018Y	P080E	E156P	E207M	I251H	V302R	G350D	E396Y
N019A	P080F	F157A	E207P	I251K	V302S	G350E	K397A
N019C	P080G	F157C	E207Q	I251P	V302T	G350F	K397C
N019F	P080I	F157D	E207R	I251S	V302Y	G350H	K397E
N019G	P080K	F157E	E207S	I251T	I303A	G350K	K397F
N019H	P080L	F157G	E207T	I251W	I303C	G350L	K397G
N019I	P080M	F157H	E207V	R252A	I303D	G350M	K397I
N019L	P080N	F157I	E207W	R252D	I303E	G350N	K397L
N019M	P080R	F157K	I208D	R252E	I303F	G350P	K397M
N019P	P080S	F157L	I208G	R252F	I303G	G350R	K397P
N019Q	P080T	F157M	I208P	R252G	I303K	G350S	K397Q
N019R	P080V	F157P	I208W	R252H	I303L	G350T	K397T
N019S	P080Y	F157Q	K209C	R252I	I303M	G350V	K397V
N019V	Q081A	F157R	K209P	R252K	I303R	G350Y	F398A
N019W	Q081C	F157S	R210A	R252L	I303W	V351C	F398C
N019Y	Q081E	F157T	R210C	R252N	I303Y	V351D	F398E
A020D	Q081G	F157V	R210D	R252P	W304A	V351E	F398G
A020E	Q081H	E158D	R210E	R252S	W304C	V351F	F398H
A020F	Q081L	E158K	R210G	R252T	W304D	V351H	F398I
A020H	Q081N	E158P	R210K	R252Y	W304G	V351N	F398L
A020K	Q081P	E158R	R210M	V253A	W304I	V351R	F398N
A020L	Q081S	E158Y	R210N	V253D	W304M	V351W	F398P
A020N	Q081V	K159W	R210P	V253E	W304N	V351Y	F398R
A020P	Q081W	K159Y	R210S	V253G	W304P	C352A	F398S
A020R	Q081Y	G161W	R210T	V253H	W304Q	C352D	F398T
A020T	K082W	D163C	R210V	V253L	W304S	C352E	F398V
A020V	K082Y	D163P	R210W	V253M	W304T	C352F	F398W
A020Y	I083E	F164A	R210Y	V253N	W304V	C352G	F398Y
P021A	I083K	F164C	N211C	V253Q	W304Y	C352K	Y399D
P021C	S084Y	F164D	N211F	V253R	G305L	C352M	Y399P
P021D	L085A	F164E	N211G	V253S	G305P	C352P	C400A

030252

P021E	L085C	F164G	N211H	V253W	G305Q	C352Q	C400D
P021G	L085D	F164H	N211I	S254C	G305R	C352R	C400E
P021H	L085E	F164N	N211K	S254D	G305S	C352S	C400F
P021I	L085F	F164P	N211M	S254E	G305T	C352T	C400G
P021L	L085G	F164Q	N211P	S254G	G305V	C352V	C400I
P021M	L085H	F164R	N211R	S254I	G305Y	C352W	C400L
P021R	L085N	L165C	N211S	S254K	T306A	C352Y	C400M
P021S	L085Q	L165H	N211T	S254L	T306C	I353C	C400P
P021T	L085S	L165P	N211V	S254P	T306H	I353F	C400Q
P021V	L085T	L165T	N211W	S254Q	T306I	I353G	C400R
P021W	Q086C	V166D	D212A	S254R	T306L	I353H	C400S
S022C	Q086P	E167V	D212G	S254T	T306V	I353K	C400T
S022E	D087P	T168A	D212H	S254V	T306W	I353L	C400V
S022G	H088A	T168C	D212I	S254W	T306Y	I353M	C400Y
S022K	H088C	T168D	D212K	S254Y	L307C	I353Q	S401C
S022P	H088E	T168E	D212L	K255C		I353R	S401F
E023A	H088F	T168F	D212M	K255D	L307I	I353S	S401H
E023F	H088G	T168G	D212P	K255L	L307P	I353W	S401K
E023L	H088I	T168K	D212V	K255P	S308C	R354C	S401R
E023M	H088K	T168L	D212W	K255V	S308F	R354D	S401W
E023N	H088L	T168P	D213P	K255W	S308L	R354E	S401Y
E023P	H088M	T168R	D213S	I256C	S308M	R354G	C402A
E023R	H088P	T168S	L214A	I256D	S308V	R354H	C402D
E023S	H088R	T168V	L214C	I256E	S308W	R354I	C402E
E023T	H088S	T168W	L214D	I256G	S308Y	R354K	C402F
E023V	H088T	T168Y	L214E	I256P	M310C	R354L	C402L
C025D	H088V	I169A	L214G	P257D	M310E	R354M	C402M
C025E	H088Y	I169D	L214H	D258L	M310F	R354P	C402P
C025F	L089A	I169F	L214K	D258P	M310K	R354Q	C402Q
C025G	L089D	I169G	L214N	D258V	M310L	R354S	C402R
C025H	L089E	I169H	L214P	D258W	R311C	R354V	C402S
C025I	L089G	I169K	L214R	K260C	R311E	R354W	C402T
C025K	L089Q	I169N	L214S	K260P	R311F	R354Y	C402V
C025L	L089S	I169P	L214T	S261P	R311I	K355D	C402W
C025N	L089T	I169Q	L214Y	P262A	R311L	K355F	C402Y
C025P	L089W	I169S	S215C	P262D	R311P	K355G	Y403A
C025R	L089Y	I169T	S215P	P262E	R311V	K355H	Y403C
C025S	D090C	I169Y	W216D	P262F	R311W	K355L	Y403E
C025T	D090G	K170C	W216E	P262G	S312C	K355M	Y403G
C025V	K091D	K170D	W216G	P262H	S312E	K355N	Y403H
C025Y	K091E	K170E	W216H	P262I	S312M	K355P	Y403K
G027C	K091F	K170G	W216I	P262K	S312V	K355Q	Y403L
L033C	K091G	K170M	W216K	P262Q	S312W	K355R	Y403M
L033D	K091H	K170P	W216L	P262R	M313C	K355S	Y403N
L033H	K091I	K170W	W216M	P262S	K314C	K355T	Y403P
L033N	K091L	K170Y	W216N	P262T	K314L	K355V	Y403Q

030252

L033V	K091N	L171C	W216P	P262V	K314W	K355W	Y403R
L033Y	K091T	L171D	W216Q	P262W	S315C	K355Y	Y403T
D034I	A092E	L171H	W216R	P262Y	S315I	N356C	S404C
D034L	A092F	L171M	W216T	L263E	S315V	N356G	S404D
D034N	A092H	L171N	W216V	L263F	C316E	N356K	S404F
D034S	A092K	L171R	L217A	L263P	C316G	N356L	S404G
D034T	A092P	L171S	L217C	L263Q	C316I	N356P	S404H
D034V	A092Q	L171W	L217G	L263W	C316K	N356R	S404L
M035A	A092R	L171Y	L217H	P264D	C316L	N356T	S404M
M035D	A092W	G172D	L217P	P264E	C316M	N356V	S404N
M035G	A092Y	G172E	L217Q	P264F	C316P	N356W	S404R
M035P	K094G	G172I	L217S	P264G	C316R	W357D	S404V
M035R	K094P	G172L	L217T	P264L	C316S	W357E	S404W
M035S	D095A	G172P	L217V	P264M	C316T	W357F	S404Y
S036C	D095C	G172Q	L217W	P264R	C316V	W357G	T405C
S036F	D095E	G172T	W218A	P264T	C316W	W357L	T405I
S036V	D095F	G172V	W218I	P264V	C316Y	W357M	T405V
S036W	D095G	G172W	W218K	P264W	L317G	W357Q	L406P
S036Y	D095H	G172Y	W218L	P264Y	L317P	W357R	L406R
L037C	D095K	K173D	W218P	V265A	L318C	N358E	C408A
L037E	D095L	K173E	W218S	V265D	L318P	N358H	C408E
L037G	D095M	K173G	W218V	V265F	L318W	N358I	C408F
L037N	D095P	K173H	N219P	V265G	L319C	N358K	C408G
L037S	D095Q	K173I	E220G	V265H	L319E	N358P	C408I
F038E	D095S	K173L	E220K	V265K	L319F	N358Q	C408K
F038G	D095V	K173M	E220N	V265L	L319G	N358R	C408L
F038K	D095W	K173P	E220P	V265M	L319H	N358W	C408P
F038L	D095Y	K173S	E220R	V265N	L319I	S359A	C408R
F038N	I096A	K173V	E220W	V265Q	L319K	S359F	C408S
F038Q	I096C	K173W	S221D	V265R	L319M	S359G	C408T
F038R	I096G	K173Y	S221E	V265S	L319P	S359L	C408V
F038T	I096H	L174P	S221H	F266A	L319Q	S359P	C408W
F038W	I096P	L175C	S221K	F266C	L319R	S359W	C408Y
S039C	I096R	L175D	S221P	F266G	L319S	S360A	E410W
S039D	I096S	L175G	S221R	F266H	L319V	S360C	K411D
S039F	I096T	L175K	T222P	F266M	L319W	S360E	K411E
S039W	I096W	L175P	T222Y	F266P	L319Y	S360F	K411F
F040A	F098P	L175R	A223C	F266Q	D320C	S360G	K411G
F040D	Y099C	L175S	A223D	F266R	D320P	S360I	A412E
F040E	Y099E	R176A	A223E	F266S	D320V	S360K	A412H
F040G	Y099G	R176C	A223G	F266T	N321E	S360L	D413H
F040K	Y099I	R176E	A223H	F266V	N321M	S360M	D413I
F040N	Y099N	R176F	A223K	F266W	N321P	S360P	D413K
F040R	Y099P	R176G	A223L	A267D	Y322C	S360Q	D413L
F040S	Y099V	R176H	A223P	A267G	Y322D	S360R	D413P
F040T	Y099W	R176I	A223Q	A267H	Y322E	S360V	V414A

030252

F040V	M100C	R176P	A223R	A267I	Y322G	D361A	V414D
I041Q	M100E	R176Q	A223S	A267K	Y322I	D361C	V414E
G042D	M100F	R176S	A223T	A267N	Y322L	D361E	V414G
G042E	M100G	R176T	A223V	A267R	Y322N	D361G	V414H
G042H	M100N	R176V	A223W	A267S	Y322P	D361M	V414K
G042I	M100P	R176W	A223Y	A267W	Y322R	D361N	V414R
G042K	M100R	P177A	L224A	Y268A	Y322S	D361P	V414S
G042L	M100S	P177C	L224D	Y268C	Y322T	D361Q	V414T
G042M	M100T	P177D	L224E	Y268F	Y322V	D361R	K415C
G042P	M100W	P177F	L224F	Y268G	Y322W	D361S	K415D
G042Q	M100Y	P177G	L224G	Y268H	M323A	D361V	K415E
G042R	P101A	P177H	L224M	Y268K	M323C	D361W	K415P
G042S	P101C	P177L	L224P	Y268L	M323E	Y362A	D416C
G042T	P101F	P177M	L224Q	Y268N	M323G	Y362C	D416S
G042V	P101H	P177Q	L224R	Y268P	M323H	Y362E	T417A
S043A	P101I	P177R	L224S	Y268Q	M323K	Y362G	T417D
S043E	P101K	P177S	L224T	Y268S	M323N	Y362H	T417E
S043F	P101L	P177T	L224W	Y268T	M323R	Y362K	T417F
S043G	P101M	P177V	L224Y	Y268V	M323S	Y362L	T417G
S043I	P101N	P177W	Y225A	Y268W	M323T	Y362M	T417H
S043K	P101Q	N178E	Y225D	T269E	M323V	Y362N	T417K
S043L	P101R	N178I	Y225E	T269K	E324C	Y362P	T417M
S043Q	P101S	N178L	Y225G	T269L	E324F	Y362R	T417P
S043R	P101T	N178V	Y225H	T269M	E324P	Y362S	T417Q
S043V	V102P	N178W	Y225K	T269N	E324V	Y362T	T417R
P044A	D103A	N178Y	Y225P	T269P	E324W	Y362V	A419D
P044C	D103E	H179W	Y225Q	T269Q	E324Y	Y362W	A419P
P044F	D103F	L180A	Y225R	T269R	T325C	L363A	V420A
P044G	D103G	L180C	Y225T	R270A	T325R	L363C	V420D
P044H	D103H	L180E	Y225V	R270C	I326E	L363D	V420F
P044I	D103I	L180P	Y225W	R270E	I326G	L363E	V420G
P044L	D103L	L180R	P226A	R270F	I326H	L363F	V420H
P044N	D103Q	L180S	P226C	R270G	I326N	L363G	V420K
P044Q	D103R	W181A	P226D	R270H	I326W	L363H	V420L
P044R	D103T	W181C	P226E	R270I	L327A	L363I	V420N
P044S	D103V	W181D	P226F	R270P	L327E	L363P	V420R
P044T	D103W	W181E	P226G	R270Y	L327F	L363Q	V420S
P044W	D103Y	W181F	P226L	I271A	L327G	L363R	V420T
P044Y	N104F	W181H	P226N	I271D	L327H	L363S	V420W
R045A	N104P	W181I	P226Q	I271E	L327N	L363T	V420Y
R045D	N104W	W181K	P226R	I271H	L327Q	L363V	V422C
R045F	L105C	W181L	P226S	I271K	L327R	L363W	V422D
R045G	L105M	W181R	P226T	I271T	L327S	H364A	V422G
R045P	L105N	W181S	P226V	I271W	L327T	H364C	V422H
R045W	G106A	W181V	P226W	V272A	L327V	H364D	V422L
I046P	G106C	G182A	P226Y	V272H	L327W	H364E	V422M

030252

I046W	G106D	G182C	S227A	V272L	L327Y	H364F	V422N
N047V	G106F	G182D	S227F	V272N	P329C	H364G	V422Q
A048P	G106H	G182E	S227G	V272P	P329F	H364K	V422R
T049C	G106L	G182H	S227H	V272W	P329G	H364L	V422S
T049D	G106M	G182N	S227I	F273A	P329H	H364M	V422Y
T049G	G106N	G182P	S227K	F273C	P329I	H364P	C423A
T049H	G106P	G182Q	S227L	F273D	P329K	H364R	C423D
T049P	G106S	G182R	S227M	F273G	P329L	H364S	C423E
	G106W	G182S	S227P	F273I	P329N	H364T	C423F
Q051C	G106Y	G182T	S227Q	F273L	P329Q	H364V	C423G
Q051F	M107A	G182V	S227R	F273P	P329R	H364Y	C423H
Q051I	M107C	G182Y	S227T	F273Q	P329S	L365A	C423L
Q051M	M107H	Y183C	S227V	F273S	P329T	L365C	C423M
Q051P	M107K	Y183D	S227W	F273V	P329V	L365D	C423P
Q051T	M107P	Y183E	S227Y	F273W	P329W	L365E	C423Q
Q051W	M107Q	Y183G	I228A	T274C	P329Y	L365G	C423R
Q051Y	M107S	Y183I	I228E	T274E	Y330A	L365M	C423S
G052C	M107V	Y183K	I228F	T274G	Y330C	L365N	C423T
G052E	M107W	Y183N	I228G	T274H	Y330D	L365P	C423V
G052F	A108D	Y183P	I228H	T274N	Y330E	L365Q	C423W
G052W	A108E	Y183Q	I228L	T274Q	Y330G	L365R	I424A
G052Y	A108F	Y183R	I228M	T274W	Y330I	L365S	I424C
V053A	A108K	Y183S	I228N	T274Y	Y330L	L365T	I424E
V053C	A108L	Y183V	I228P	D275A	Y330M	L365W	I424G
V053D	A108M	Y184A	I228R	D275F	Y330N	L365Y	I424H
V053E	A108P	Y184C	I228S	D275G	Y330P	N366A	I424N
V053G	A108Q	Y184D	I228T	D275I	Y330R	N366C	I424Q
V053H	A108T	Y184E	I228W	D275K	Y330S	N366E	I424R
V053L	A108V	Y184F	Y229E	D275L	Y330V	N366F	I424S
V053N	A108Y	Y184G	Y229F	D275M	Y330W	N366G	I424W
V053P	V109C	Y184H	Y229G	D275Q	I331A	N366K	I424Y
V053Q	V109D	Y184K	Y229K	D275T	I331C	N366M	A425E
V053R	V109E	Y184L	Y229L	D275V	I331D	N366P	A425L
V053S	V109L	Y184M	Y229P	D275W	I331E	N366Q	A425P
V053T	V109M	Y184P	Y229Q	Q276F	I331F	N366R	A425W
V053W	V109R	Y184R	Y229T	Q276P	I331H	N366T	A425Y
V053Y	V109T	Y184S	Y229V	Q276W	I331K	N366W	D426C
T054D	V109W	Y184V	Y229W	L278M	I331Q	P367E	D426F
T054E	I110F	L185A	L230A	L278P	I331R	P367F	D426M
T054G	I110K	L185D	L230E	K279A	I331S	P367I	D426R
T054P	I110L	L185E	L230G	K279C	I331T	P367L	G427A
T054R	I110M	L185F	L230H	K279F	I331W	P367M	G427C
T054Y	I110P	L185G	L230K	K279G	I331Y	P367Q	G427F
I055A	I110W	L185I	L230M	K279L	I332A	P367V	G427L
I055D	D111H	L185K	L230N	K279W	I332C	D368C	G427P
I055G	D111I	L185P	L230P	K279Y	I332D	D368P	

030252

I055H	D111Q	L185R	L230R	F280D	I332E	D368W	G427V
I055N	W112C	L185S	L230S	F280I	I332F	N369C	G427W
I055P	W112E	L185T	L230T	F280L	I332G	N369E	G427Y
I055Q	W112G	L185V	L230V	F280M	I332H	N369F	V428A
I055R	W112H	L185W	L230W	F280N	I332K	N369I	V428C
I055T	W112L	L185Y	L230Y	F280R	I332L	N369K	V428D
I055V	W112N	F186A	N231A	F280S	I332N	N369L	V428E
I055Y	W112P	F186D	N231C	F280T	I332P	N369P	V428G
F056A	W112S	F186G	N231D	F280V	I332R	N369Q	V428H
F056C	E113R	F186H	N231F	F280W	I332S	N369V	V428N
F056E	E113V	F186I	N231G	L281A	I332T	N369W	V428R
F056G	E114I	F186K	N231H	L281D	I332Y	F370A	V428S
F056H	E114L	F186L	N231I	L281G	N333G	F370D	V428Y
F056I	E114P	F186N	N231K	L281H	N333H	F370E	C429A
F056K	E114T	F186P	N231L	L281I	N333I	F370G	C429D
F056L	E114V	F186Q	N231P	L281K	N333K	F370H	C429K
F056P	W115A	F186R	N231Q	L281N	N333P	F370K	C429L
F056R	W115C	F186S	N231R	L281P	N333R	F370L	C429N
F056S	W115D	F186V	N231S	L281Q	N333S	F370N	C429P
F056T	W115F	F186W	N231V	L281R	N333T	F370P	C429S
F056V	W115G	P187A	T232C	L281S	N333W	F370Q	C429T
F056W	W115H	P187F	T232G	L281V	N333Y	F370R	C429V
Y057A	W115I	P187G	T232H	L281W	V334A	F370S	C429W
Y057D	W115K	P187H	T232K	S282F	V334C	F370V	C429Y
Y057F	W115L	P187I	T232L	S282L	V334D	F370Y	I430A
Y057G	W115M	P187L	T232N	S282V	V334E	A371P	I430D
Y057I	W115R	P187M	T232P	S282W	V334G	A371W	I430E
Y057L	W115S	P187N	T232Q	S282Y	V334M	I372A	I430L
Y057M	W115V	P187Q	T232V	Q283A	V334N	I372D	I430M
Y057P	W115Y	P187R	T232Y	Q283C	V334R	I372E	I430N
Y057Q	R116A	P187S	Q233D	Q283D	V334S	I372F	I430S
Y057R	R116C	P187T	Q233I	Q283F	T335F	I372G	I430T
Y057V	R116D	P187V	Q233P	Q283W	T335G	I372H	I430V
Y057W	R116E	P187W	Q233S	D284C	T335H	I372K	D431P
V058A	R116G	P187Y	Q233T	D284I	T335I	I372L	A432C
D059A	R116H	D188A	Q234A	D284P	T335K	I372N	A432F
D059E	R116I	D188C	Q234D	E285K	T335L	I372P	A432I
D059I	R116L	D188F	Q234E	E285P	T335P	I372R	A432K
D059L	R116N	D188G	Q234G	E285R	T335V	I372S	A432L
D059M	R116P	D188H	Q234H	E285T	T335W	I372T	A432M
D059P	R116Q	D188L	Q234N	E285V	T335Y	I372V	A432P
D059R	R116S	D188M	Q234P	L286A	L336A	I372W	A432Y
D059T	R116V	D188N	Q234S	L286C	L336E	Q373C	L434H
D059V	R116W	D188P	Q234T	L286D	L336F	Q373P	L434K
D059W	P117D	D188Q	Q234V	L286F	L336G	Q373W	L434P
D059Y	P117G	D188R	Q234W	L286H	L336K	L374D	L434Q

R060A	P117I	D188S	S235F	L286K	L336N	L374E	L434R
R060D	P117K	D188T	S235L	L286M	L336P	E375C	L434W
R060F	P117N	D188V	S235M	L286P	L336R	E375F	P437T
R060G	P117Q	D188W	S235R	L286T	L336S	E375P	M438Y
R060H	P117R	C189A	S235W	L286Y	L336T	E375V	E439N
R060I	P117S	C189E	S235Y	V287A	L336V	E375Y	E439R
R060L	P117V	C189G	P236C	V287C	R121G	K376I	T440Q
R060N	P117W	C189H	W119L	V287D	R121H	K376P	E441R
R060P	T118C	C189K	W119N	V287E	R121K	K376W	E442M
R060Q	T118D	C189L	W119P	V287G	R121L	G377C	E442N
R060S	T118E	C189M	W119R	V287K	R121M	G377I	E442S
R060T	T118G	C189N	R121A	V287L	R121P	G377L	P443D
T118R	T118P	T118W	R121C	R121F	G378D	G377V	G378E
T118Y	W119I	W119A	W119K	R121E	G378F	G378I	

Пример 5. Анализ активности гиалуронидазы в условиях температуры и присутствия фенола.

Супернатанты активных вариантов PH20, представленных в табл. 9, идентифицированные, как описано в примере 4, были испытаны на стабильность в условиях повышенной температуры и/или присутствия фенола. Анализ для измерения активности гиалуронидазы в условиях повышенной температуры и присутствия фенола с использованием биотинилированного-НА (bНА) в качестве субстрата для измерения активности гиалуронидазы был изменен по сравнению с первоначальным анализом, описанным в примере 3, тем, что он включает 4-часовую инкубацию образцов при 37°C совместно с м-крезолом или без него перед измерением ферментативной активности. Анализ используется для идентификации мутантов PH20 с термофильными свойствами (активность выше при 37°C, чем при 4°C) и/или мутантов PH20 с фенофильными свойствами (большая активность чем у PH20 дикого типа в присутствии м-крезола).

1. Предварительный скрининг.

Перед инкубацией образцов с bНА образцы вариантов PH20 разводили в определённых лунках планшета 4XNB без покрытия для предварительной инкубации при 37°C в течение 4 ч в следующих условиях: 1) предварительная инкубация при 37°C с 0,4% м-крезола; и 2) предварительная инкубация при 37°C без 0,4% м-крезола. Для предварительной инкубации при 37°C с 0,4% м-крезола из 50% (объем/объем) исходного раствора м-крезола получали промежуточный 1% раствор м-крезола. Коротко, в стеклянной пробирке Wheaton емкостью 2 мл готовили исходный 50% раствор м-крезола (Fluka, номер по каталогу 65996; Spectrum, номер по каталогу C2773) в метаноле, по данным плотности раствора ($D = 1,034$ г/л). Пробирку закрывали и хранили при -20°C в защищенном от света месте в малых аликвотах. Затем 1% промежуточный раствор готовили путем разбавления раствора в аналитическом буфере HEPES (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 мг/мл BSA, pH 7,4, 0,05% Tween-20) непосредственно перед использованием в вытяжном шкафу при встряхивании.

Затем повторности образцов супернатантов трансфицированных вариантов, приведенных в табл. 9, полученные, как описано выше в примере 2, были по отдельности подвергнуты разбавлению при соотношении 1% м-крезол в аналитическом буфере HEPES/супернатант после трансфекции 1:2,5, чтобы получить конечную концентрацию м-крезола 0,4%. Для предварительной инкубации при 37°C без 0,4% м-крезола образцы супернатантов трансфицированных вариантов подвергали разведению при соотношении аналитический HEPES буфер/трансфицированный супернатант 1:2,5. Кроме того, для каждого условия был также включен внутренний контроль потери активности при максимальной концентрации 3 Ед/мл гНuPH20 в буфере HEPES, pH 7,4 (получен, как описано в примере 1), который был разбавлен так же, как описано выше для трансфицированных образцов. Планшеты закрывали герметичными крышками и инкубировали при 37°C в течение 4 ч.

Подготовка планшетов, покрытых bНА, и блокирование планшетов перед добавлением супернатантов трансфицированных вариантов PH20 или PH20 дикого типа были такими же, как описано в примере 3. Анализ был модифицирован следующим образом. Во-первых, образцы разводили 1:10 в двух повторностях в буфере HEPES для анализа в планшетах 4XNB. Для каждого варианта образцы, которые были испытаны, представляли собой 1) предварительно не инкубированные супернатанты трансфицированных вариантов (без инкубации; 4°C); 2) супернатанты трансфицированных вариантов, предварительно инкубированные при 37°C в течение 4 ч с 0,4% м-крезолом (крезолом); или 3) супернатанты трансфицированных вариантов, предварительно инкубированные при 37°C в течение 4 ч без 0,4% м-крезола (без крезола; 37°C). Кроме того, также были протестированы образцы с максимальной концентрацией. Стандартная кривая была построена с использованием гНuPH20, как описано в примере 3, без м-крезола. 100 мкл из каждого стандарта и образца переносили в предварительно определенные лунки с покрытием bНА, планшет блокировали и инкубировали в течение приблизительно 1,5 ч при 37°C. Таким образом, каждый образец каждого варианта был испытан в четырех повторностях за счет предварительной инкубации образцов каждого супернатанта трансфицированных вариантов в двух повторностях на стадии предварительной инкубации и дополнительного разделения на две повторности каждого образца на ста-

дии анализа bHA.

После инкубации планшеты промывали и детектировали связывание с bHA, как описано выше в примере 3. Оптическую плотность измеряли при 450 нм в течение 30 мин после добавления стоп-раствора.

Активность в Ед/мл рассчитывали по стандартной кривой и сравнивали. Результаты выражали в виде процента активности, оставшейся после воздействия каждого из следующих параметров: отношение активности при 1) 37°C без предварительной инкубации с м-крезолом/4°C; 2) после предварительной инкубации при 37°C с м-крезолом/4°C; и 3) после предварительной инкубации при 37°C с м-крезолом/после предварительной инкубации при 37°C без м-крезола. Предварительные фенофильные варианты для повторного подтверждения были определены как варианты, которые в двух повторностях показали процент оставшейся активности при условии 3) > 20% от первоначальной активности при 37°C.

Предварительные фенофильные варианты были перескринированы с помощью повторного анализа с применением 6-луночного планшета. Для повторного скрининга плазмидная ДНК, соответствующая потенциальному фенофильному варианту, была трансформирована в бактерии *E.coli*, и эту плазмидную ДНК подготавливали и очищали с использованием набора MaxiPrep в соответствии с инструкциями производителя. Последовательность ДНК была подтверждена.

Плазмидную ДНК трансфицировали в монослой клеток CHO-S (Invitrogen, Cat. No. 11619-012), выращенных на 6-луночных планшетах при плотности около 50-80%, с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668-027) в соответствии с инструкциями производителя. Трансфекции выполняли в двух повторностях. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 96 ч после трансфекции перед сбором супернатанта для анализа. В качестве контроля клетки также были трансфицированы экспрессионным вектором HZ24-PH20(OHO)-IRES-SEAP (SEQ ID NO: 4), который содержит кодон-оптимизированную последовательность PH20 дикого типа (ОНО). Нетрансфицированные клетки также присутствовали в качестве контрольных.

Через 96 ч после трансфекции от каждого образца, в том числе от контролей ОНО и нетрансфицированных клеток, собирали супернатант и анализировали его на активность гиалуронидазы в различных условиях, как описано выше: 1) супернатанты трансфицированных вариантов без предварительной инкубации (без инкубации; 4°C); 2) супернатанты, предварительно инкубированные при 37°C в течение 4 ч с 0,4% м-крезолом (крезолом); или 3) супернатанты трансфицированных вариантов, предварительно инкубированные при 37°C в течение 4 ч без 0,4% м-крезола (без крезола; 37°C). Активность гиалуронидазы определяли, как описано выше, с использованием анализа bHA.

Результаты оценивали, как описано выше. Абсолютную активность гиалуронидазы (Ед/мл) получали по стандартной кривой. Кроме того, процент активности определяли как отношение активности при 37°C/4°C, 37°C в присутствии м-крезола/4°C и 37°C в присутствии м-крезола/37°C. Результаты приведены в табл. 11 и 12 ниже.

Абсолютная гиалуронидазная активность

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
L001A	2,993	2,511	3,529	3,214	0,287	0,295
L001E	2,669	2,539	2,862	3,179	0,376	0,341
L001G	0,348	0,583	0,596	0,676	0,055	0,031
L001Q	5,135	6,443	6,133	5,719	0,621	0,636
L001R	5,603	4,390	6,576	7,042	0,458	0,396
P006A	2,965	3,208	4,088	3,495	0,404	0,435
V008M	1,376	1,401	1,856	1,678	0,000	0,008
I009Q	0,447	0,381	0,469	0,476	0,031	0,030
P010G	0,747	0,564	0,820	0,688	0,123	0,114
P010H	0,473	0,485	0,624	0,548	0,000	0,000
N011S	0,862	0,962	1,313	1,263	0,094	0,064
V012E	11,019	5,519	5,312	5,528	0,753	0,934
V012I	2,804	3,844	3,610	6,566	0,106	0,090
V012K	1,691	1,963	2,479	2,243	0,330	0,321
F014V	0,144	0,165	0,222	0,242	0,003	0,000
L015M	0,902	1,073	1,026	0,901	0,017	0,017
A020S	1,494	2,205	2,822	2,620	0,413	0,397
S022T	3,035	3,788	3,375	3,273	0,684	0,748
L026M	1,482	1,226	2,027	1,704	0,224	0,178
K028R	0,944	0,845	1,043	0,925	0,112	0,095
F029R	1,195	1,511	1,848	1,839	0,140	0,140
F029S	3,019	3,615	3,566	3,521	0,250	0,283
F029T	1,451	1,712	1,839	2,065	0,220	0,212
P032C	0,370	0,419	0,476	0,534	0,006	0,040
L033G	0,566	0,700	0,686	0,627	0,001	0,026
D034W	0,340	0,321	0,499	0,471	0,076	0,069
M035V	0,887	0,639	0,721	0,652	0,116	0,023
S036H	1,109	0,752	1,178	1,135	0,117	0,026
S036N	0,797	0,933	0,893	0,859	0,171	0,260

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
L037M	0,574	0,404	0,455	0,353	0,049	0,032
F040L	2,603	3,941	3,515	4,148	0,277	0,361
I046L	3,027	2,959	4,011	3,342	0,513	0,557
N047D	2,222	2,359	2,573	2,639	0,032	0,021
N047W	0,404	0,415	0,423	0,456	0,000	0,017
A048N	12,398	45,971	14,252	23,873	0,797	0,902
T049R	7,893	13,334	9,685	12,102	0,563	0,649
G050D	3,287	3,148	3,084	3,020	0,242	0,264
G050M	1,763	2,333	2,780	3,244	0,250	0,393
G052N	7,217	9,809	6,939	13,978	1,109	1,083
G052T	1,542	1,224	1,795	1,433	0,381	0,463
G052S	2,152	1,999	2,120	1,963	0,498	0,566
V058C	1,428	1,312	1,321	1,301	0,212	0,210
V058K	28,000	28,000	61,016	61,016	23,586	23,586
V058R	5,719	4,688	5,542	4,822	3,134	3,149
V058N	1,200	1,175	1,550	1,525	0,200	0,175
V058Y	1,040	0,770	1,071	1,088	0,388	0,454
V058Q	11,956	15,363	18,458	45,092	1,567	2,166
V058P	3,360	2,949	2,799	5,121	0,592	0,884
V058H	3,790	5,074	7,590	9,222	0,826	1,205
D068P	0,215	0,215	0,213	0,180	0,001	0,184
S069T	1,927	2,179	2,671	2,671	0,289	0,240
I070P	1,284	1,593	1,306	1,589	0,010	0,032
I070V	1,818	2,437	3,099	3,335	0,433	0,363
V073Q	4,846	5,441	5,880	5,827	0,383	0,477
V073R	0,522	0,803	0,720	0,804	0,018	0,059
T074E	2,903	3,834	3,868	3,871	0,666	0,626
T074M	0,569	0,744	0,656	0,771	0,079	0,083
T074N	2,792	1,905	2,565	2,995	0,281	0,204
T074P	2,331	1,593	2,525	2,648	0,309	0,265
T074R	0,999	0,820	0,806	1,066	0,060	0,023
T074V	1,186	1,280	1,365	1,460	0,101	0,080
V075M	0,917	1,087	1,233	1,321	0,003	0,028
K082L	1,362	1,311	1,563	3,302	0,325	0,354
K082N	3,202	3,411	3,396	3,244	0,792	0,861
I083V	3,706	2,633	5,194	3,615	1,552	1,017
I083Q	2,376	1,946	2,665	3,674	0,720	0,510
I083S	0,841	1,054	0,880	1,005	0,235	0,268
I083G	2,276	2,443	2,418	1,866	0,545	0,601
S084E	1,470	1,484	1,834	1,683	0,115	0,115
S084F	1,179	1,212	0,982	1,103	0,025	0,000
S084N	2,255	1,888	3,268	2,476	0,597	0,547
S084R	8,534	14,779	10,230	30,016	1,117	1,494
Q086A	2,084	2,120	2,845	3,310	0,405	0,322
Q086H	1,187	1,000	1,218	1,296	0,087	0,065
Q086K	0,127	0,110	0,126	0,072	0,032	0,023
Q086S	2,528	2,082	2,539	2,149	0,173	0,241

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
Q086T	3,018	2,542	2,832	4,562	0,290	0,406
D087G	2,755	2,176	2,252	1,971	0,034	0,122
D087L	2,070	2,277	2,195	2,311	0,324	0,299
D087M	2,262	2,325	2,510	2,038	0,191	0,335
D087S	5,210	10,305	6,983	14,399	0,569	0,928
D087V	1,361	1,364	1,553	1,187	0,142	0,189
D090E	8,251	12,299	7,666	19,836	1,093	1,234
D090N	2,812	2,775	3,123	2,737	0,379	0,290
K093Q	2,491	2,065	2,267	1,971	0,132	0,131
K093R	2,986	2,862	3,094	2,842	0,362	0,465
K094D	2,393	2,088	2,071	2,132	0,135	0,211
K094R	1,407	1,542	1,764	1,676	0,158	0,166
T097C	0,330	0,618	0,545	0,505	0,044	0,087
T097D	0,520	0,565	0,643	0,664	0,055	0,073
T097E	1,096	1,410	1,394	1,623	0,217	0,262
T097L	0,899	1,198	1,065	1,241	0,246	0,300
N104R	2,508	2,356	2,876	2,790	0,279	0,238
A120H	2,155	2,551	2,028	2,883	0,168	0,199
D127R	0,264	0,339	0,149	0,199	0,105	0,068
V128I	3,120	3,313	3,546	3,401	0,389	0,504
N131M	15,335	20,678	27,143	15,899	0,505	0,447
N131R	8,195	8,748	7,724	8,392	1,645	1,626
N131V	1,656	1,870	2,280	1,962	0,233	0,214
R132L	3,306	3,235	3,259	2,966	0,337	0,430
Q138L	1,494	1,660	1,611	1,521	0,410	0,347
Q140K	2,829	4,065	4,996	4,464	0,546	0,559
N141R	1,290	1,320	1,334	1,527	0,058	0,035
N141S	2,201	2,708	2,900	2,966	0,135	0,164
N141W	1,475	1,568	1,927	1,643	0,100	0,105
V142D	2,552	2,186	2,914	3,193	0,128	0,067
V142G	1,357	1,796	1,597	1,621	0,211	0,219
V142K	3,532	2,381	3,867	3,681	0,571	0,575
V142N	0,432	0,567	0,672	0,589	0,103	0,087
V142P	4,624	7,213	7,722	7,021	1,074	1,081
V142Q	5,090	6,900	7,618	6,897	0,678	0,678
V142R	1,968	2,595	2,941	2,689	0,364	0,330
V142S	2,789	2,988	4,763	3,497	0,416	0,591
V142T	1,926	3,260	4,313	4,031	0,495	0,472
Q143G	3,922	4,903	5,632	4,846	0,782	0,780
Q143K	3,634	3,671	7,285	5,008	1,043	1,039
L144R	3,810	4,581	5,191	5,107	0,556	0,520
L144T	1,496	1,681	1,941	1,831	0,285	0,219
L146P	0,818	0,782	0,954	0,904	0,011	0,031
T147S	0,984	1,149	1,399	1,497	0,055	0,039
T150N	0,442	0,585	0,622	0,684	0,039	0,046
T150S	1,747	1,400	1,875	1,988	0,120	0,121
E151A	2,870	2,269	2,965	2,860	0,359	0,337

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
E151L	3,365	3,289	4,446	4,007	0,218	0,251
E151S	5,187	4,591	5,987	6,262	0,371	0,294
E151T	2,442	3,000	3,134	3,309	0,000	0,000
E151V	3,998	4,247	4,459	4,232	0,326	0,314
E151W	7,166	14,248	11,352	13,524	0,131	0,121
K152T	1,204	1,377	1,796	1,883	0,100	0,067
K152W	2,084	1,795	2,549	2,406	0,063	0,069
E158S	0,339	0,397	0,451	0,407	0,000	0,000
K162E	0,168	0,195	0,114	0,080	0,004	0,024
L165F	4,775	5,250	5,075	5,075	0,600	0,725
V166Q	1,883	2,507	2,937	2,958	0,392	0,324
V166T	0,993	1,315	1,821	1,800	0,231	0,235
E167D	0,811	0,910	1,109	1,480	0,111	0,056
I169L	1,812	1,796	2,540	2,196	0,335	0,341
K170R	1,578	2,054	2,536	1,995	0,209	0,201
G172A	0,413	0,581	0,692	0,777	0,052	0,056
K173R	1,654	1,551	1,766	2,083	0,173	0,156
L174G	0,184	0,087	0,210	0,230	0,026	0,031
L174N	1,616	2,276	2,494	2,872	0,331	0,543
L174T	0,552	0,566	0,689	0,820	0,090	0,050
N178K	2,931	4,375	4,891	4,513	0,258	0,362
N178R	8,160	13,820	16,287	20,033	0,665	0,790
H193Q	1,060	1,367	2,264	1,888	0,346	0,346
K195T	1,227	0,806	1,548	1,911	0,348	0,292
K195N	1,266	1,437	1,649	1,385	0,369	0,353
K196E	0,732	0,660	0,663	1,017	0,244	0,239
K196R	2,246	2,285	2,383	2,174	0,315	0,384
F204P	3,500	4,550	2,925	3,750	2,475	4,725
N205A	0,515	0,837	0,717	0,854	0,153	0,160
N205E	1,011	2,004	1,627	1,870	0,314	0,346
N205L	1,084	1,029	1,165	0,000	0,123	0,088
N205T	0,295	0,367	0,428	0,406	0,043	0,053
V206I	0,317	0,508	0,600	0,565	0,079	0,088
K209R	2,041	2,453	2,445	1,951	0,291	0,077
D212N	5,568	4,549	6,271	6,016	0,167	0,322
D212S	1,987	1,502	2,442	2,222	0,204	0,152
D213A	0,235	0,283	0,432	0,438	0,116	0,060
D213M	1,664	2,080	2,650	2,046	0,181	0,142
S215H	2,448	3,056	2,670	2,414	0,268	0,139
S215M	1,497	2,175	2,618	1,630	0,110	0,146
N219I	0,338	0,250	0,860	0,728	0,076	0,082
E220V	3,783	3,828	4,993	4,349	0,371	0,257
T222G	3,528	5,262	5,399	5,549	0,033	0,044
T232F	0,539	1,242	0,716	0,781	0,089	0,153
Q233G	0,041	0,095	0,115	0,121	0,000	0,000
Q234M	6,029	6,031	5,764	4,871	1,286	0,988
S235A	0,550	0,502	0,714	0,607	0,079	0,073

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
V237C	0,623	0,708	0,860	0,824	0,000	0,000
V237H	0,303	0,316	0,370	0,459	0,046	0,034
V237T	0,152	0,196	0,254	0,247	0,054	0,053
A238E	2,050	1,800	1,945	2,559	0,159	0,171
A238H	0,579	0,363	0,345	0,743	0,090	0,062
T240A	1,107	0,900	1,564	1,302	0,143	0,118
T240Q	0,333	0,510	0,542	0,617	0,080	0,085
R248A	2,274	2,499	2,575	3,115	0,027	0,075
E249V	3,001	3,894	4,284	4,325	0,655	0,712
P257G	3,981	4,452	4,985	5,022	0,039	0,034
K260M	0,719	0,960	0,839	0,935	0,072	0,068
S261A	3,253	3,117	1,872	2,686	1,264	1,451
S261K	6,089	5,421	9,860	6,297	1,583	1,437
S261N	14,149	40,257	20,219	14,303	2,115	1,917
A267T	0,052	0,095	0,102	0,106	0,036	0,041
F273H	0,340	0,436	0,417	0,519	0,025	0,031
F273Y	0,558	0,505	0,668	0,519	0,052	0,050
Q276H	2,706	1,877	2,027	1,997	0,181	0,201
Q276M	0,775	0,768	0,762	0,806	0,043	0,000
Q276R	6,080	9,717	7,383	14,593	0,807	1,281
Q276S	1,353	1,212	1,497	1,681	0,149	0,147
V277A	1,202	1,643	1,692	2,129	0,118	0,110
V277E	2,440	2,340	4,289	4,577	0,161	0,239
V277H	5,548	5,302	7,181	7,300	0,227	0,512
V277K	8,950	8,996	33,627	33,627	4,442	4,045
V277M	1,279	1,622	1,754	1,818	0,264	0,270
V277N	14,351	4,306	12,865	11,772	0,938	0,796
V277Q	5,459	5,461	6,547	6,343	0,373	0,493
V277R	18,300	12,038	17,581	20,641	2,737	2,023
V277S	14,351	10,444	9,509	15,135	0,727	0,716
V277T	8,412	7,804	8,497	11,184	0,679	0,871
L278E	4,416	2,795	3,330	2,800	0,170	0,202
L278G	7,502	7,456	9,173	7,760	0,596	0,612
K279H	0,888	1,087	1,234	1,339	0,185	0,269
V287T	0,580	0,667	0,843	0,832	0,139	0,100
T289S	0,783	1,019	0,819	1,001	0,008	0,007
G291S	0,227	0,322	0,419	0,385	0,051	0,016
G291V	3,662	3,707	4,131	5,599	0,821	0,706
E292C	1,344	1,599	1,711	1,617	0,138	0,144
E292F	6,106	4,697	8,422	6,216	0,520	0,363
E292H	2,620	3,316	4,458	3,830	0,389	0,451
E292R	2,810	2,178	3,155	2,829	0,398	0,339
E292V	0,891	1,121	1,453	1,494	0,193	0,177
T293A	1,986	3,110	2,546	1,789	0,086	0,076
A298G	0,161	0,274	0,342	0,236	0,030	0,022
L307G	0,616	0,661	0,726	0,605	0,000	0,000
S308D	0,264	0,325	0,337	0,344	0,014	0,010

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
S308K	0,651	0,722	0,826	0,716	0,011	0,000
S308N	3,995	4,406	6,808	6,128	0,386	0,362
I309E	3,166	2,819	3,921	3,663	0,637	0,528
I309G	6,651	5,429	6,824	6,194	0,503	0,400
I309L	0,326	0,403	0,501	0,431	0,048	0,047
I309M	2,809	2,473	3,467	3,383	0,278	0,239
I309N	4,865	5,191	5,444	5,054	0,380	0,327
I309S	10,719	28,759	18,217	158,604	0,748	1,367
I309T	3,052	2,509	2,989	3,735	0,228	0,207
I309V	1,705	1,292	1,929	1,787	0,029	0,062
M310G	4,514	6,397	7,568	7,084	0,866	0,915
M310Q	3,648	3,179	3,912	3,380	1,088	0,955
M313G	0,252	0,325	0,348	0,355	0,034	0,036
M313H	3,767	5,276	10,243	10,395	0,380	0,404
M313K	12,689	12,122	15,085	12,984	0,129	0,072
M313P	4,050	2,951	4,198	3,919	0,209	0,177
M313R	4,634	10,863	7,288	3,568	0,337	0,296
M313T	2,903	4,474	4,705	4,467	0,331	0,313
M313Y	1,063	1,262	1,276	1,300	0,096	0,089
K314S	2,848	4,450	4,042	5,879	0,391	0,533
K314Y	0,093	0,131	0,226	0,182	0,013	0,020
S315A	1,472	1,082	1,345	1,484	0,222	0,148
S315H	2,412	3,242	3,648	3,414	0,440	0,371
S315Y	0,279	0,626	0,477	0,362	0,146	0,143
L317A	3,254	2,845	4,019	3,776	0,280	0,317
L317I	1,078	1,524	2,021	1,687	0,257	0,180
L317K	12,129	9,382	11,668	12,591	0,402	0,445
L317N	2,907	3,066	3,703	3,717	0,445	0,540
L317R	8,631	15,187	20,585	15,106	0,796	0,857
L317S	11,586	29,267	10,535	25,114	1,637	1,613
L317T	1,338	1,073	1,953	1,656	0,136	0,018
L317W	0,810	1,128	1,326	1,665	0,158	0,171
L318D	1,750	1,970	1,847	1,930	0,322	0,322
L318H	1,073	0,806	1,072	1,005	0,046	0,074
L318R	2,856	3,464	4,583	4,187	0,258	0,260
N321R	3,069	4,409	5,059	4,946	0,482	0,426
N321S	0,683	0,710	0,700	0,772	0,058	0,035
E324N	4,309	2,530	4,508	3,321	0,348	0,303
T325E	1,071	1,270	1,337	1,352	0,193	0,143
N328G	0,379	0,504	0,747	0,553	0,031	0,040
N328Y	2,629	4,543	4,758	4,543	0,490	0,477
T335S	0,905	0,787	0,977	0,986	0,113	0,062
Q347A	8,316	11,961	8,432	11,508	0,918	1,266
Q347G	1,358	1,120	3,021	2,319	0,253	0,209
Q349M	1,493	1,629	1,486	1,760	0,178	0,217
Q349R	0,451	0,572	0,663	0,598	0,078	0,079
V351S	1,379	1,633	1,804	1,647	0,000	0,000

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
I353V	2,335	1,954	3,090	2,697	0,323	0,321
N356H	0,445	0,451	0,445	0,588	0,038	0,023
N356S	0,262	0,253	0,136	0,318	0,000	0,008
S359E	2,616	2,635	3,547	3,560	0,382	0,333
S359H	0,403	0,371	0,445	0,374	0,000	0,000
P367A	0,643	0,782	1,074	0,996	0,139	0,131
P367G	0,593	0,530	0,686	0,650	0,000	0,000
P367K	0,707	0,767	0,890	0,513	0,045	0,052
P367S	3,967	3,478	2,946	3,073	0,424	0,505
D368A	1,762	2,321	2,143	1,895	0,031	0,040
D368E	3,464	4,944	5,772	4,842	0,530	0,555
D368L	0,557	0,566	0,607	0,619	0,000	0,006
D368M	0,861	1,065	1,031	1,104	0,028	0,028
D368R	4,503	5,270	7,418	6,226	0,754	0,735
D368T	2,345	1,993	2,512	2,525	0,072	0,085
N369R	1,548	2,719	2,503	2,022	0,160	0,125
A371F	2,760	5,207	4,974	3,980	0,308	0,222
A371H	8,101	86,587	77,531	77,531	1,403	1,316
A371H	3,509	4,058	3,900	3,879	0,000	0,334
A371K	2,903	3,546	3,963	4,055	0,509	0,505
A371L	11,018	40,668	76,587	43,516	1,159	0,964
A371L	3,328	3,445	3,472	2,075	0,000	0,025
A371R	25,855	25,855	n/a	n/a	2,851	3,634
A371R	6,592	7,733	7,987	7,576	0,000	0,196
A371S	3,329	3,505	4,916	4,611	0,412	0,781
L374P	2,939	7,129	11,522	8,771	0,665	0,646
E375A	0,627	0,507	0,557	0,683	0,000	0,014
E375G	1,596	1,299	2,025	1,806	0,209	0,265
E375R	0,937	1,132	1,529	1,318	0,201	0,260
K376D	0,458	0,312	0,518	0,515	0,064	0,026
K376E	1,572	1,094	1,572	1,674	0,213	0,174
K376Q	0,727	0,940	0,910	0,846	0,116	0,102
K376R	2,086	1,351	1,704	2,690	0,539	0,279
K376T	0,847	1,001	1,026	1,135	0,153	0,064
K376V	0,834	0,861	1,036	1,021	0,033	0,026
K376Y	1,316	0,777	1,353	0,747	0,125	0,097
G377D	1,159	1,332	1,285	1,763	0,202	0,186
G377E	0,877	0,926	1,144	1,189	0,092	0,088
G377H	3,037	3,432	4,460	3,598	0,372	0,364
G377K	3,445	4,101	6,405	4,911	0,283	0,245
G377R	1,096	1,257	1,312	1,191	0,077	0,085
G377S	0,453	0,452	0,492	0,457	0,034	0,036
G377T	2,198	2,313	2,474	2,522	0,424	0,461
F380W	17,497	27,987	25,734	29,353	2,566	2,716
T381S	2,861	3,161	3,886	3,558	0,521	0,367
R383I	1,959	6,936	10,340	6,820	0,655	0,513
R383S	2,429	2,548	3,228	3,044	0,339	0,321

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
K385A	0,479	0,669	0,604	0,754	0,028	0,000
K385Q	1,746	2,089	2,403	2,609	0,217	0,196
K385V	1,232	1,750	1,387	1,410	0,071	0,042
E389A	6,872	10,944	21,081	24,610	0,449	0,449
E389G	0,166	0,203	0,188	0,284	0,004	0,000
E389L	1,814	2,142	2,598	2,403	0,370	0,303
E389Q	2,547	3,432	3,459	3,423	0,411	0,437
E389S	1,847	2,640	3,059	2,456	0,000	0,007
E392A	1,797	1,370	2,021	2,133	0,147	0,136
E392F	1,575	1,407	1,821	2,023	0,071	0,079
E392Q	5,826	4,653	6,583	4,364	0,693	0,729
E392R	4,555	5,306	5,900	6,548	0,218	0,193
E392V	3,817	2,936	4,747	4,544	0,367	0,291
Q393F	1,754	2,186	2,455	2,222	0,260	0,226
Q393M	1,252	1,826	1,749	1,588	0,028	0,049
S395A	4,220	6,127	8,788	6,906	1,141	0,856
S395H	1,609	2,261	2,574	2,564	0,323	0,268
E396A	1,135	1,184	1,497	1,524	0,126	0,149
E396H	0,357	0,532	0,751	0,684	0,069	0,022
E396Q	1,310	1,625	1,611	1,559	0,162	0,160
E396S	3,375	5,709	5,274	6,380	0,146	0,129
Y399T	2,538	3,250	3,313	3,989	0,000	0,002
Y399V	2,738	2,697	3,028	3,129	0,484	0,557
Y399W	1,400	1,883	1,715	1,946	0,236	0,233
S401A	2,636	3,171	3,216	3,148	0,447	0,410
S401E	1,685	1,601	2,110	2,060	0,344	0,309
S404A	1,288	1,635	1,924	1,724	0,000	0,019
L406F	0,706	0,490	0,867	0,716	0,000	0,000
L406N	0,617	0,795	0,943	1,044	0,060	0,070
S407A	2,428	2,949	3,432	3,255	0,389	0,548
S407D	2,090	5,790	5,038	5,682	0,569	0,575
S407P	2,660	2,708	3,812	3,301	0,261	0,366
A412Q	2,001	2,918	2,925	2,902	0,279	0,247
A412R	4,562	5,132	6,390	6,347	0,570	0,596
A412V	2,581	3,451	3,789	3,511	0,189	0,189
D416L	0,610	0,817	0,737	1,043	0,130	0,160
D418R	4,541	4,847	5,347	5,438	0,406	0,583
A419H	10,409	20,311	25,109	38,221	2,214	2,293
A419K	12,835	10,298	24,536	208,289	2,556	3,173
D421A	5,968	5,617	6,094	16,940	0,761	0,764
D421H	48,012	48,012	160,106	32,481	16,300	28,113
D421K	5,527	5,225	6,864	5,346	0,523	0,725
D421N	9,060	8,635	10,039	8,645	1,502	1,422
D421Q	7,529	5,581	7,858	8,016	0,842	0,994
D421R	6,637	5,463	9,211	7,537	0,815	0,737
D421S	5,556	5,355	7,899	8,898	0,869	0,762
A425G	10,421	8,827	7,796	10,676	0,827	1,189

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезоло (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
G427Q	1,008	1,252	1,342	1,230	0,031	0,106
G427T	1,330	1,380	1,664	1,643	0,080	0,065
V428L	2,138	2,769	2,930	3,029	0,053	0,030
D431E	2,810	2,220	1,972	2,112	0,519	0,438
D431H	2,154	3,185	4,017	3,028	0,294	0,301
D431K	8,123	16,953	19,563	11,575	2,272	2,339
D431L	1,211	1,215	1,564	1,448	0,164	0,170
D431N	11,819	12,063	16,358	15,131	1,601	1,399
D431Q	6,077	9,828	14,157	10,760	1,533	1,153
D431S	14,523	10,220	11,338	9,075	0,853	0,829
F433A	4,035	4,673	5,943	4,649	0,581	0,595
F433H	1,836	2,397	2,574	2,108	0,347	0,356
F433I	2,754	2,643	2,990	2,299	0,338	0,382
F433K	17,815	14,495	16,240	49,615	1,806	1,790
F433R	8,198	6,719	10,572	8,960	1,113	0,857
F433T	6,005	5,941	9,716	8,019	1,327	1,542
F433V	10,645	7,762	150,315	8,696	2,415	1,505
F433W	0,526	0,795	0,784	0,903	0,082	0,068
P437I	0,759	0,996	1,130	1,066	0,027	0,019
M438A	1,996	1,518	2,125	2,060	0,214	0,210
M438D	2,849	2,522	3,002	2,857	0,305	0,074
M438E	4,681	4,992	5,386	5,680	0,431	0,518
M438L	10,127	5,268	6,663	11,324	0,670	0,739
M438N	6,172	5,531	8,050	5,568	0,649	0,662
M438T	2,218	2,411	2,308	2,500	0,309	0,304
E439A	3,557	4,432	4,883	4,235	0,568	0,596
E439A	1,099	0,998	1,694	1,470	0,080	0,109
E439C	0,148	0,256	0,286	0,286	0,042	0,045
E439K	0,466	0,588	0,580	0,616	0,077	0,065
E439P	2,868	3,736	3,394	3,267	0,529	0,490
E439Q	1,070	0,848	1,087	1,080	0,116	0,115
E439T	1,965	1,889	2,179	2,323	0,313	0,263
T440D	4,148	4,443	4,931	3,533	0,568	0,651
T440H	2,317	1,982	3,297	2,595	0,147	0,196
T440M	3,397	3,305	2,878	2,873	0,254	0,367
T440P	3,562	3,593	3,987	3,277	0,540	0,566
T440S	2,522	2,207	2,533	2,895	0,283	0,284
E441F	1,402	1,407	1,813	1,560	0,204	0,178
E442G	2,871	3,340	3,193	3,347	0,327	0,367
P443E	0,907	0,710	0,856	0,928	0,044	0,063
P443F	1,830	2,370	2,683	2,321	0,301	0,286
P443G	4,077	2,921	9,751	4,614	0,835	0,756
Q444E	8,293	3,861	6,800	6,213	0,581	0,594
Q444H	3,823	3,936	5,746	4,710	0,486	0,513
Q444V	2,193	2,107	2,847	2,583	0,384	0,284
I445M	5,265	4,438	4,480	4,489	0,773	0,691
I445N	3,375	4,024	3,592	3,515	0,499	0,455

Мутант	Без инкубации (4°C)		37°C без крезола (37°C)		37°C с м-крезолом (37°C в присутствии м-крезола)	
I445W	2,289	2,694	2,683	2,695	0,314	0,296
Y447E	2,373	2,464	2,363	2,685	0,391	0,345
Y447G	0,945	1,352	1,358	1,401	0,187	0,162
Y447P	0,991	1,383	1,379	1,490	0,190	0,183
Положительный контроль (ОНО)	2,919	2,173	2,773	2,105	0,145	0,178
	3,984	4,463	4,215	4,823	0,189	0,253
	3	2,725	3	3,325	0,1	0,125
	2,501	2,883	2,370	3,158	0,452	0,522
	7,629	2,989	10,835	3,914	0,485	0,219
	5,783	5,356	2,609	3,643	0,542	0,402
	5,279	5,422	2,815	4,026	0,618	0,401
	4,775	4,385	2,845	3,327	0,718	0,540
	3,617	4,264	3,322	3,427	0,633	0,479
	5,881	4,511	5,518	4,359	0,743	0,848
	6,754	4,932	3,902	4,120	0,665	0,724
	3,911	3,494	3,911	5,179	0,726	0,841
	5,406	7,559	4,018	4,620	0,735	0,429
	4,015	3,887	3,9400	3,4080	0,3340	0,3410
	2,604	2,339	2,4430	2,3910	0,2350	0,2330
3,736	3,473	3,6210	3,0560	0,3100	0,2770	
3,759	3,509	3,6330	3,0490	0,3600	0,3030	

п/а (значение не доступно; например вне пределов обнаружения)

Таблица 12

Процент (%) активности

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
L001A	117,908	8,13	9,59	127,997	9,179	11,75
L001E	107,231	13,14	14,09	125,207	10,727	13,43
L001G	171,264	9,23	15,80	115,952	4,586	5,32
L001Q	119,435	10,13	12,09	88,763	11,121	9,87
L001R	117,366	6,96	8,17	160,410	5,623	9,02
P006A	137,875	9,88	13,63	108,946	12,446	13,56
V008M	134,884	0,00	0,00	119,772	0,477	0,57
I009Q	104,922	6,61	6,94	124,934	6,303	7,87
P010G	109,772	15,00	16,47	121,986	16,570	20,21
P010H	131,924	0,00	0,00	112,990	0,000	0,00
N011S	152,320	7,16	10,90	131,289	5,067	6,65
V012E	48,208	14,18	6,83	100,163	16,896	16,92
V012I	128,745	2,94	3,78	170,812	1,371	2,34
V012K	146,600	13,31	19,52	114,264	14,311	16,35
F014V	154,167	1,35	2,08	146,667	0,000	0,00
L015M	113,747	1,66	1,88	83,970	1,887	1,58

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
A020S	188,889	14,64	27,64	118,821	15,153	18,00
S022T	111,203	20,27	22,54	86,404	22,854	19,75
L026M	136,775	11,05	15,11	138,989	10,446	14,52
K028R	110,487	10,74	11,86	109,467	10,270	11,24
F029R	154,644	7,58	11,72	121,707	7,613	9,27
F029S	118,119	7,01	8,28	97,400	8,037	7,83
F029T	126,740	11,96	15,16	120,619	10,266	12,38
P032C	128,649	1,26	1,62	127,446	7,491	9,55
L033G	121,201	0,15	0,18	89,571	4,147	3,71
D034W	146,765	15,23	22,35	146,729	14,650	21,50
M035V	81,285	16,09	13,08	102,034	3,528	3,60
S036H	106,222	9,93	10,55	150,931	2,291	3,46
S036N	112,045	19,15	21,46	92,069	30,268	27,87
L037M	79,268	10,77	8,54	87,376	9,065	7,92
F040L	135,036	7,88	10,64	105,252	8,703	9,16
I046L	132,507	12,79	16,95	112,944	16,667	18,82
N047D	115,797	1,24	1,44	111,869	0,796	0,89
N047W	104,703	0,00	0,00	109,880	3,728	4,10
A048N	114,954	5,59	6,43	51,931	3,778	1,96
T049R	122,704	5,81	7,13	90,760	5,363	4,87
G050D	93,824	7,85	7,36	95,934	8,742	8,39
G050M	157,686	8,99	14,18	139,048	12,115	16,85
G052N	96,148	15,98	15,37	142,502	7,748	11,04
G052T	116,407	21,23	24,71	117,075	32,310	37,83
G052S	98,513	23,49	23,14	98,199	28,833	28,31
V058C	92,507	16,05	14,85	99,162	16,141	16,01
V058K	217,914	38,66	84,24	217,914	38,655	84,24
V058R	96,905	56,55	54,80	102,858	65,305	67,17
V058N	129,167	12,90	16,67	129,787	11,475	14,89
V058Y	102,981	36,23	37,31	141,299	41,728	58,96
V058Q	154,383	8,49	13,11	293,510	4,804	14,10
V058P	83,304	21,15	17,62	173,652	17,262	29,98
V058H	200,264	10,88	21,79	181,750	13,067	23,75
D068P	99,070	0,47	0,47	83,721	102,222	85,58
S069T	138,609	10,82	15,00	122,579	8,985	11,01
I070P	101,713	0,77	0,78	99,749	2,014	2,01
I070V	170,462	13,97	23,82	136,849	10,885	14,90
V073Q	121,337	6,51	7,90	107,094	8,186	8,77
V073R	137,931	2,50	3,45	100,125	7,338	7,35

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
T074E	133,241	17,22	22,94	100,965	16,172	16,33
T074M	115,290	12,04	13,88	103,629	10,765	11,16
T074N	91,870	10,96	10,06	157,218	6,811	10,71
T074P	108,323	12,24	13,26	166,227	10,008	16,64
T074R	80,681	7,44	6,01	130,000	2,158	2,80
T074V	115,093	7,40	8,52	114,063	5,479	6,25
V075M	134,460	0,24	0,33	121,527	2,120	2,58
K082L	114,758	20,79	23,86	251,869	10,721	27,00
K082N	106,059	23,32	24,73	95,104	26,541	25,24
I083V	140,151	29,88	41,88	137,296	28,133	38,63
I083Q	112,163	27,02	30,30	188,798	13,881	26,21
I083S	104,637	26,70	27,94	95,351	26,667	25,43
I083G	106,239	22,54	23,95	76,381	32,208	24,60
S084E	124,762	6,27	7,82	113,410	6,833	7,75
S084F	83,291	2,55	2,12	91,007	0,000	0,00
S084N	144,922	18,27	26,47	131,144	22,092	28,97
S084R	119,873	10,92	13,09	203,099	4,977	10,11
Q086A	136,516	14,24	19,43	156,132	9,728	15,19
Q086H	102,612	7,14	7,33	129,600	5,015	6,50
Q086K	99,213	25,40	25,20	65,455	31,944	20,91
Q086S	100,435	6,81	6,84	103,218	11,215	11,58
Q086T	93,837	10,24	9,61	179,465	8,900	15,97
D087G	81,742	1,51	1,23	90,579	6,190	5,61
D087L	106,039	14,76	15,65	101,493	12,938	13,13
D087M	110,964	7,61	8,44	87,656	16,438	14,41
D087S	134,031	8,15	10,92	139,728	6,445	9,01
D087V	114,107	9,14	10,43	87,023	15,922	13,86
D090E	92,910	14,26	13,25	161,281	6,221	10,03
D090N	111,060	12,14	13,48	98,631	10,596	10,45
K093Q	91,008	5,82	5,30	95,448	6,646	6,34
K093R	103,617	11,70	12,12	99,301	16,362	16,25
K094D	86,544	6,52	5,64	102,107	9,897	10,11
K094R	125,373	8,96	11,23	108,690	9,905	10,77
T097C	165,152	8,07	13,33	81,715	17,228	14,08
T097D	123,654	8,55	10,58	117,522	10,994	12,92
T097E	127,190	15,57	19,80	115,106	16,143	18,58
T097L	118,465	23,10	27,36	103,589	24,174	25,04
N104R	114,673	9,70	11,12	118,421	8,530	10,10
A120H	94,107	8,28	7,80	113,015	6,903	7,80

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
D127R	56,439	70,47	39,77	58,702	34,171	20,06
V128I	113,654	10,97	12,47	102,656	14,819	15,21
N131M	177,000	1,86	3,29	76,888	2,811	2,16
N131R	94,253	21,30	20,07	95,930	19,376	18,59
N131V	137,681	10,22	14,07	104,920	10,907	11,44
R132L	98,578	10,34	10,19	91,685	14,498	13,29
Q138L	107,831	25,45	27,44	91,627	22,814	20,90
Q140K	176,600	10,93	19,30	109,815	12,522	13,75
N141R	103,411	4,35	4,50	115,682	2,292	2,65
N141S	131,758	4,66	6,13	109,527	5,529	6,06
N141W	130,644	5,19	6,78	104,783	6,391	6,70
V142D	114,185	4,39	5,02	146,066	2,098	3,06
V142G	117,686	13,21	15,55	90,256	13,510	12,19
V142K	109,485	14,77	16,17	154,599	15,621	24,15
V142N	155,556	15,33	23,84	103,880	14,771	15,34
V142P	166,998	13,91	23,23	97,338	15,397	14,99
V142Q	149,666	8,90	13,32	99,957	9,830	9,83
V142R	149,441	12,38	18,50	103,622	12,272	12,72
V142S	170,778	8,73	14,92	117,035	16,900	19,78
V142T	223,936	11,48	25,70	123,650	11,709	14,48
Q143G	143,600	13,88	19,94	98,837	16,096	15,91
Q143K	200,468	14,32	28,70	136,421	20,747	28,30
L144R	136,247	10,71	14,59	111,482	10,182	11,35
L144T	129,746	14,68	19,05	108,923	11,961	13,03
L146P	116,626	1,15	1,34	115,601	3,429	3,96
T147S	142,175	3,93	5,59	130,287	2,605	3,39
T150N	140,724	6,27	8,82	116,923	6,725	7,86
T150S	107,327	6,40	6,87	142,000	6,087	8,64
E151A	103,310	12,11	12,51	126,047	11,783	14,85
E151L	132,125	4,90	6,48	121,830	6,264	7,63
E151S	115,423	6,20	7,15	136,397	4,695	6,40
E151T	128,337	0,00	0,00	110,300	0,000	0,00
E151V	111,531	7,31	8,15	99,647	7,420	7,39
E151W	158,415	1,15	1,83	94,919	0,895	0,85
K152T	149,169	5,57	8,31	136,747	3,558	4,87
K152W	122,313	2,47	3,02	134,039	2,868	3,84
E158S	133,038	0,00	0,00	102,519	0,000	0,00
K162E	67,857	3,51	2,38	41,026	30,000	12,31
L165F	106,283	11,82	12,57	96,667	14,286	13,81

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
V166Q	155,975	13,35	20,82	117,990	10,953	12,92
V166T	183,384	12,69	23,26	136,882	13,056	17,87
E167D	136,745	10,01	13,69	162,637	3,784	6,15
I169L	140,177	13,19	18,49	122,272	15,528	18,99
K170R	160,710	8,24	13,24	97,128	10,075	9,79
G172A	167,554	7,51	12,59	133,735	7,207	9,64
K173R	106,771	9,80	10,46	134,300	7,489	10,06
L174G	114,130	12,38	14,13	264,368	13,478	35,63
L174N	154,332	13,27	20,48	126,186	18,907	23,86
L174T	124,819	13,06	16,30	144,876	6,098	8,83
N178K	166,871	5,27	8,80	103,154	8,021	8,27
N178R	199,596	4,08	8,15	144,957	3,943	5,72
H193Q	213,585	15,28	32,64	138,113	18,326	25,31
K195T	126,161	22,48	28,36	237,097	15,280	36,23
K195N	130,253	22,38	29,15	96,381	25,487	24,57
K196E	90,574	36,80	33,33	154,091	23,500	36,21
K196R	106,100	13,22	14,02	95,142	17,663	16,81
F204P	83,571	84,62	70,71	82,418	126,000	103,85
N205A	139,223	21,34	29,71	102,031	18,735	19,12
N205E	160,930	19,30	31,06	93,313	18,503	17,27
N205L	107,472	10,56	11,35	0,000	#DIV/0!	8,55
N205T	145,085	10,05	14,58	110,627	13,054	14,44
V206I	189,274	13,17	24,92	111,220	15,575	17,32
K209R	119,794	11,90	14,26	79,535	3,947	3,14
D212N	112,626	2,66	3,00	132,249	5,352	7,08
D212S	122,899	8,35	10,27	147,936	6,841	10,12
D213A	183,830	26,85	49,36	154,770	13,699	21,20
D213M	159,255	6,83	10,88	98,365	6,940	6,83
S215H	109,069	10,04	10,95	78,992	5,758	4,55
S215M	174,883	4,20	7,35	74,943	8,957	6,71
N219I	254,438	8,84	22,49	291,200	11,264	32,80
E220V	131,985	7,43	9,81	113,610	5,909	6,71
T222G	153,033	0,61	0,94	105,454	0,793	0,84
T232F	132,839	12,43	16,51	62,882	19,590	12,32
Q233G	280,488	0,00	0,00	127,368	0,000	0,00
Q234M	95,605	22,31	21,33	80,766	20,283	16,38
S235A	129,818	11,06	14,36	120,916	12,026	14,54
V237C	138,042	0,00	0,00	116,384	0,000	0,00
V237H	122,112	12,43	15,18	145,253	7,407	10,76

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м- крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
V237T	167,105	21,26	35,53	126,020	21,457	27,04
A238E	94,878	8,17	7,76	142,167	6,682	9,50
A238H	59,585	26,09	15,54	204,683	8,345	17,08
T240A	141,283	9,14	12,92	144,667	9,063	13,11
T240Q	162,763	14,76	24,02	120,980	13,776	16,67
R248A	113,237	1,05	1,19	124,650	2,408	3,00
E249V	142,752	15,29	21,83	111,068	16,462	18,28
P257G	125,220	0,78	0,98	112,803	0,677	0,76
K260M	116,690	8,58	10,01	97,396	7,273	7,08
S261A	57,547	67,52	38,86	86,173	54,021	46,55
S261K	161,931	16,05	26,00	116,159	22,820	26,51
S261N	142,901	10,46	14,95	35,529	13,403	4,76
A267T	196,154	35,29	69,23	111,579	38,679	43,16
F273H	122,647	6,00	7,35	119,037	5,973	7,11
F273Y	119,713	7,78	9,32	102,772	9,634	9,90
Q276H	74,908	8,93	6,69	106,393	10,065	10,71
Q276M	98,323	5,64	5,55	104,948	0,000	0,00
Q276R	121,431	10,93	13,27	150,180	8,778	13,18
Q276S	110,643	9,95	11,01	138,696	8,745	12,13
V277A	140,765	6,97	9,82	129,580	5,167	6,70
V277E	175,779	3,75	6,60	195,598	5,222	10,21
V277H	129,434	3,16	4,09	137,684	7,014	9,66
V277K	375,721	13,21	49,63	373,799	12,029	44,96
V277M	137,138	15,05	20,64	112,084	14,851	16,65
V277N	89,645	7,29	6,54	273,386	6,762	18,49
V277Q	119,930	5,70	6,83	116,151	7,772	9,03
V277R	96,071	15,57	14,96	171,465	9,801	16,81
V277S	66,260	7,65	5,07	144,916	4,731	6,86
V277T	101,010	7,99	8,07	143,311	7,788	11,16
L278E	75,408	5,11	3,85	100,179	7,214	7,23
L278G	122,274	6,50	7,94	104,077	7,887	8,21
K279H	138,964	14,99	20,83	123,183	20,090	24,75
V287T	145,345	16,49	23,97	124,738	12,019	14,99
T289S	104,598	0,98	1,02	98,234	0,699	0,69
G291S	184,581	12,17	22,47	119,565	4,156	4,97
G291V	112,807	19,87	22,42	151,039	12,609	19,05
E292C	127,307	8,07	10,27	101,126	8,905	9,01
E292F	137,930	6,17	8,52	132,340	5,840	7,73
E292H	170,153	8,73	14,85	115,501	11,775	13,60

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
E292R	112,278	12,61	14,16	129,890	11,983	15,56
E292V	163,075	13,28	21,66	133,274	11,847	15,79
T293A	128,197	3,38	4,33	57,524	4,248	2,44
A298G	212,422	8,77	18,63	86,131	9,322	8,03
L307G	117,857	0,00	0,00	91,528	0,000	0,00
S308D	127,652	4,15	5,30	105,846	2,907	3,08
S308K	126,882	1,33	1,69	99,169	0,000	0,00
S308N	170,413	5,67	9,66	139,083	5,907	8,22
I309E	123,847	16,25	20,12	129,940	14,414	18,73
I309G	102,601	7,37	7,56	114,091	6,458	7,37
I309L	153,681	9,58	14,72	106,948	10,905	11,66
I309M	123,425	8,02	9,90	136,797	7,065	9,66
I309N	111,901	6,98	7,81	97,361	6,470	6,30
I309S	169,951	4,11	6,98	551,493	0,862	4,75
I309T	97,936	7,63	7,47	148,864	5,542	8,25
I309V	113,138	1,50	1,70	138,313	3,470	4,80
M310G	167,656	11,44	19,18	110,739	12,916	14,30
M310Q	107,237	27,81	29,82	106,323	28,254	30,04
M313G	138,095	9,77	13,49	109,231	10,141	11,08
M313H	271,914	3,71	10,09	197,024	3,886	7,66
M313K	118,882	0,86	1,02	107,111	0,555	0,59
M313P	103,654	4,98	5,16	132,802	4,516	6,00
M313R	157,272	4,62	7,27	32,845	8,296	2,72
M313T	162,074	7,04	11,40	99,844	7,007	7,00
M313Y	120,038	7,52	9,03	103,011	6,846	7,05
K314S	141,924	9,67	13,73	132,112	9,066	11,98
K314Y	243,011	5,75	13,98	138,931	10,989	15,27
S315A	91,372	16,51	15,08	137,153	9,973	13,68
S315H	151,244	12,06	18,24	105,305	10,867	11,44
S315Y	170,968	30,61	52,33	57,827	39,503	22,84
L317A	123,510	6,97	8,60	132,724	8,395	11,14
L317I	187,477	12,72	23,84	110,696	10,670	11,81
L317K	96,199	3,45	3,31	134,204	3,534	4,74
L317N	127,382	12,02	15,31	121,233	14,528	17,61
L317R	238,501	3,87	9,22	99,467	5,673	5,64
L317S	90,929	15,54	14,13	85,810	6,423	5,51
L317T	145,964	6,96	10,16	154,334	1,087	1,68
L317W	163,704	11,92	19,51	147,606	10,270	15,16
L318D	105,543	17,43	18,40	97,970	16,684	16,35

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м- крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
L318H	99,907	4,29	4,29	124,690	7,363	9,18
L318R	160,469	5,63	9,03	120,872	6,210	7,51
N321R	164,842	9,53	15,71	112,180	8,613	9,66
N321S	102,489	8,29	8,49	108,732	4,534	4,93
E324N	104,618	7,72	8,08	131,265	9,124	11,98
T325E	124,837	14,44	18,02	106,457	10,577	11,26
N328G	197,098	4,15	8,18	109,722	7,233	7,94
N328Y	180,981	10,30	18,64	100,000	10,500	10,50
T335S	107,956	11,57	12,49	125,286	6,288	7,88
Q347A	101,395	10,89	11,04	96,213	11,001	10,58
Q347G	222,459	8,37	18,63	207,054	9,013	18,66
Q349M	99,531	11,98	11,92	108,042	12,330	13,32
Q349R	147,007	11,76	17,29	104,545	13,211	13,81
V351S	130,819	0,00	0,00	100,857	0,000	0,00
I353V	132,334	10,45	13,83	138,025	11,902	16,43
N356H	100,000	8,54	8,54	130,377	3,912	5,10
N356S	51,908	0,00	0,00	125,692	2,516	3,16
S359E	135,589	10,77	14,60	135,104	9,354	12,64
S359H	110,422	0,00	0,00	100,809	0,000	0,00
P367A	167,030	12,94	21,62	127,366	13,153	16,75
P367G	115,683	0,00	0,00	122,642	0,000	0,00
P367K	125,884	5,06	6,36	66,884	10,136	6,78
P367S	74,263	14,39	10,69	88,355	16,433	14,52
D368A	121,623	1,45	1,76	81,646	2,111	1,72
D368E	166,628	9,18	15,30	97,937	11,462	11,23
D368L	108,977	0,00	0,00	109,364	0,969	1,06
D368M	119,744	2,72	3,25	103,662	2,536	2,63
D368R	164,735	10,16	16,74	118,140	11,805	13,95
D368T	107,122	2,87	3,07	126,693	3,366	4,26
N369R	161,693	6,39	10,34	74,366	6,182	4,60
A371F	180,217	6,19	11,16	76,436	5,578	4,26
A371H	957,055	1,81	17,32	89,541	1,697	1,52
A371H	111,143	0,00	0,00	95,589	8,610	8,23
A371K	136,514	12,84	17,53	114,354	12,454	14,24
A371L	695,108	1,51	10,52	107,003	2,215	2,37
A371L	104,327	0,00	0,00	60,232	1,205	0,73
A371R	#VALUE!	#VALUE!	11,03	#VALUE!	#VALUE!	14,06
A371R	121,162	0,00	0,00	97,970	2,587	2,53
A371S	147,672	8,38	12,38	131,555	16,938	22,28

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м- крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
L374P	392,038	5,77	22,63	123,033	7,365	9,06
E375A	88,836	0,00	0,00	134,714	2,050	2,76
E375G	126,880	10,32	13,10	139,030	14,673	20,40
E375R	163,180	13,15	21,45	116,431	19,727	22,97
K376D	113,100	12,36	13,97	165,064	5,049	8,33
K376E	100,000	13,55	13,55	153,016	10,394	15,90
K376Q	125,172	12,75	15,96	90,000	12,057	10,85
K376R	81,687	31,63	25,84	199,112	10,372	20,65
K376T	121,133	14,91	18,06	113,387	5,639	6,39
K376V	124,221	3,19	3,96	118,583	2,547	3,02
K376Y	102,812	9,24	9,50	96,139	12,985	12,48
G377D	110,871	15,72	17,43	132,357	10,550	13,96
G377E	130,445	8,04	10,49	128,402	7,401	9,50
G377H	146,855	8,34	12,25	104,837	10,117	10,61
G377K	185,922	4,42	8,21	119,751	4,989	5,97
G377R	119,708	5,87	7,03	94,749	7,137	6,76
G377S	108,609	6,91	7,51	101,106	7,877	7,96
G377T	112,557	17,14	19,29	109,036	18,279	19,93
F380W	147,077	9,97	14,67	104,881	9,253	9,70
T381S	135,827	13,41	18,21	112,559	10,315	11,61
R383I	527,820	6,33	33,44	98,328	7,522	7,40
R383S	132,894	10,50	13,96	119,466	10,545	12,60
K385A	126,096	4,64	5,85	112,706	0,000	0,00
K385Q	137,629	9,03	12,43	124,892	7,512	9,38
K385V	112,581	5,12	5,76	80,571	2,979	2,40
E389A	306,767	2,13	6,53	224,872	1,824	4,10
E389G	113,253	2,13	2,41	139,901	0,000	0,00
E389L	143,219	14,24	20,40	112,185	12,609	14,15
E389Q	135,807	11,88	16,14	99,738	12,767	12,73
E389S	165,620	0,00	0,00	93,030	0,285	0,27
E392A	112,465	7,27	8,18	155,693	6,376	9,93
E392F	115,619	3,90	4,51	143,781	3,905	5,61
E392Q	112,993	10,53	11,89	93,789	16,705	15,67
E392R	129,528	3,69	4,79	123,407	2,947	3,64
E392V	124,365	7,73	9,61	154,768	6,404	9,91
Q393F	139,966	10,59	14,82	101,647	10,171	10,34
Q393M	139,696	1,60	2,24	86,966	3,086	2,68
S395A	208,246	12,98	27,04	112,714	12,395	13,97
S395H	159,975	12,55	20,07	113,401	10,452	11,85

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м- крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
E396A	131,894	8,42	11,10	128,716	9,777	12,58
E396H	210,364	9,19	19,33	128,571	3,216	4,14
E396Q	122,977	10,06	12,37	95,938	10,263	9,85
E396S	156,267	2,77	4,33	111,753	2,022	2,26
Y399T	130,536	0,00	0,00	122,738	0,050	0,06
Y399V	110,592	15,98	17,68	116,018	17,801	20,65
Y399W	122,500	13,76	16,86	103,346	11,973	12,37
S401A	122,003	13,90	16,96	99,275	13,024	12,93
S401E	125,223	16,30	20,42	128,670	15,000	19,30
S404A	149,379	0,00	0,00	105,443	1,102	1,16
L406F	122,805	0,00	0,00	146,122	0,000	0,00
L406N	152,836	6,36	9,72	131,321	6,705	8,81
S407A	141,351	11,33	16,02	110,376	16,836	18,58
S407D	241,053	11,29	27,22	98,135	10,120	9,93
S407P	143,308	6,85	9,81	121,898	11,088	13,52
A412Q	146,177	9,54	13,94	99,452	8,511	8,46
A412R	140,070	8,92	12,49	123,675	9,390	11,61
A412V	146,804	4,99	7,32	101,739	5,383	5,48
D416L	120,820	17,64	21,31	127,662	15,340	19,58
D418R	117,749	7,59	8,94	112,193	10,721	12,03
A419H	241,224	8,82	21,27	188,179	5,999	11,29
A419K	191,165	10,42	19,91	2022,616	1,523	30,81
D421A	102,111	12,49	12,75	301,584	4,510	13,60
D421H	333,471	10,18	33,95	67,652	86,552	58,55
D421K	124,190	7,62	9,46	102,316	13,562	13,88
D421N	110,806	14,96	16,58	100,116	16,449	16,47
D421Q	104,370	10,72	11,18	143,630	12,400	17,81
D421R	138,783	8,85	12,28	137,964	9,778	13,49
D421S	142,171	11,00	15,64	166,162	8,564	14,23
A425G	74,810	10,61	7,94	120,947	11,137	13,47
G427Q	133,135	2,31	3,08	98,243	8,618	8,47
G427T	125,113	4,81	6,02	119,058	3,956	4,71
V428L	137,044	1,81	2,48	109,390	0,990	1,08
D431E	70,178	26,32	18,47	95,135	20,739	19,73
D431H	186,490	7,32	13,65	95,071	9,941	9,45
D431K	240,835	11,61	27,97	68,277	20,207	13,80
D431L	129,149	10,49	13,54	119,177	11,740	13,99
D431N	138,404	9,79	13,55	125,433	9,246	11,60
D431Q	232,960	10,83	25,23	109,483	10,716	11,73

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
D431S	78,069	7,52	5,87	88,796	9,135	8,11
F433A	147,286	9,78	14,40	99,486	12,798	12,73
F433H	140,196	13,48	18,90	87,943	16,888	14,85
F433I	108,569	11,30	12,27	86,984	16,616	14,45
F433K	91,159	11,12	10,14	342,290	3,608	12,35
F433R	128,958	10,53	13,58	133,353	9,565	12,75
F433T	161,799	13,66	22,10	134,977	19,229	25,96
F433V	1412,071	1,61	22,69	112,033	17,307	19,39
F433W	149,049	10,46	15,59	113,585	7,530	8,55
P437I	148,880	2,39	3,56	107,028	1,782	1,91
M438A	106,463	10,07	10,72	135,705	10,194	13,83
M438D	105,370	10,16	10,71	113,283	2,590	2,93
M438E	115,061	8,00	9,21	113,782	9,120	10,38
M438L	65,794	10,06	6,62	214,958	6,526	14,03
M438N	130,428	8,06	10,52	100,669	11,889	11,97
M438T	104,058	13,39	13,93	103,691	12,160	12,61
E439A	137,279	11,63	15,97	95,555	14,073	13,45
E439A	154,140	4,72	7,28	147,295	7,415	10,92
E439C	193,243	14,69	28,38	111,719	15,734	17,58
E439K	124,464	13,28	16,52	104,762	10,552	11,05
E439P	118,340	15,59	18,44	87,446	14,998	13,12
E439Q	101,589	10,67	10,84	127,358	10,648	13,56
E439T	110,891	14,36	15,93	122,975	11,322	13,92
T440D	118,877	11,52	13,69	79,518	18,426	14,65
T440H	142,296	4,46	6,34	130,928	7,553	9,89
T440M	84,722	8,83	7,48	86,929	12,774	11,10
T440P	111,931	13,54	15,16	91,205	17,272	15,75
T440S	100,436	11,17	11,22	131,174	9,810	12,87
E441F	129,315	11,25	14,55	110,874	11,410	12,65
E442G	111,216	10,24	11,39	100,210	10,965	10,99
P443E	94,377	5,14	4,85	130,704	6,789	8,87
P443F	146,612	11,22	16,45	97,932	12,322	12,07
P443G	239,171	8,56	20,48	157,960	16,385	25,88
Q444E	81,997	8,54	7,01	160,917	9,561	15,38
Q444H	150,301	8,46	12,71	119,665	10,892	13,03
Q444V	129,822	13,49	17,51	122,591	10,995	13,48
I445M	85,090	17,25	14,68	101,149	15,393	15,57
I445N	106,430	13,89	14,79	87,351	12,945	11,31
I445W	117,213	11,70	13,72	100,037	10,983	10,99

	Повторность 1			Повторность 2		
	% активности при 37°C/4°C	% активности при 37°C + м-крезол/ 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C	% активности при 37°C / 4°C	% активности при 37°C + м-крезол / 37°C	% активности при 37°C + м-крезол / 4°C
Y447E	99,579	16,55	16,48	108,969	12,849	14,00
Y447G	143,704	13,77	19,79	103,624	11,563	11,98
Y447P	139,152	13,78	19,17	107,737	12,282	13,23
Положительный контроль (ОНО)	94,998	5,23	4,97	96,871	8,456	8,19
	105,798	4,48	4,74	108,066	5,246	5,67
	100,000	3,33	3,33	82,7780	3,759	4,59
	94,762	19,07	18,07	109,539	16,529	18,11
	142,024	4,48	6,36	130,947	5,595	7,33
	45,115	20,77	9,37	68,017	11,035	7,51
	53,324	21,95	11,71	74,253	9,960	7,40
	59,581	25,24	15,04	75,872	16,231	12,31
	91,844	19,05	17,50	80,371	13,977	11,23
	93,828	13,47	12,63	96,630	19,454	18,80
	57,773	17,04	9,85	83,536	17,573	14,68
	100,000	18,56	18,56	148,226	16,239	24,07
	74,325	18,29	13,60	61,119	9,286	5,68
	98,132	8,48	8,32	87,677	10,006	8,77
	93,817	9,62	9,02	102,223	9,745	9,96
	96,922	8,56	8,30	87,993	9,064	7,98
96,648	9,91	9,58	86,891	9,938	8,63	

n/a (значение не доступно; например вне пределов обнаружения)

2. Краткое заключение для результатов для F204P.

Для мутанта F204P описанные выше результаты для испытанного супернатанта после временной трансфекции клеток СНО-S, инкубированного в присутствии м-крезола, в анализе ферментативной активности с bNA показали, что мутантный белок F204P обладал высокой устойчивостью к обработке 0,4% м-крезолом. Полученные результаты показали, что активность, оставшаяся после 4 ч инкубации с 0,4% м-крезолом при 37°C, была примерно равна активности, наблюдаемой в условиях, когда фермент инкубировали при 4°C или при 37°C в отсутствие м-крезола. Положительный контроль (WT PH20-ОНО) показал снижение активности на 75% и 83% в день анализа (по данным анализа двух разных трансфекции ОНО). Это демонстрирует, что в условиях присутствия фенола F204P способен сохранить активность, которая выше остаточной активности контрольного фермента PH20 дикого типа на от 60% до 90% или более.

Чтобы подтвердить устойчивость F204P к обработке м-крезолом или воздействию повышенной температуры, в двух повторностях проводили вторую трансфекцию F204P с использованием клеток СНО-S, и осветленный супернатант снова испытывали на стабильность при 4°C, при 37°C в течение 4 ч в присутствии 0,4% м-крезола и при 37°C в течение 4 ч без 0,4% м-крезола. Результаты подтвердили, что мутантный фермент F204P сохраняет высокое значение активности гиалуронидазы после 4-часовой инкубации с м-крезолом при 37°C. Результаты были аналогичны результатам, полученным в первом скрининге мутанта, в любом из проведенных анализов F204P сохраняет активность, которая выше остаточной активности контрольного фермента PH20 дикого типа после 4-часовой инкубации на от 57% до более чем 90%.

Краткие результаты определения ферментативной активности F204P по сравнению с контролем дикого типа приведено в табл. 13.

Краткие результаты определения ферментативной активности

Трансфекция #	Остаточная активность после 4 ч инкубации (37°C + м-крезол/ 37°C)		% повышения активности по сравнению с диким типом (37°C)	Остаточная активность после 4 ч инкубации (37°C + м-крезол/ 4°C)		% повышения активности по сравнению с диким типом (4°C)
	F204P	Дикий тип (ОНО)		F204P	Дикий тип (ОНО)	
1	73,6%	16,4%	57,2%	86,0%	25,3%	60,7%
2	122,3%	25,2%	97,1%	109,7%	16,6%	93,1%

Пример 6. Экспрессия в большом объеме и очистка выбранных вариантов PH20.

1. Экспрессия и очистка.

Плазмидной ДНК HZ24-PH20-IRES-SEAP, содержащей кДНК, кодирующую один из вариантов PH20, трансфицировали монослой клеток CHO-S, как описано в примере 2. Клетки CHO-S культивировали в шейкерных колбах с использованием среды CD-CHO с GlutaMAX (8 мМ). В день трансфекции было подготовлено 15 колб объемом примерно 300 мл, содержащих клетки CHO-S с плотностью примерно $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки в каждой из колб объемом 300 мл трансфицировали с использованием 375 мкг плазмидной ДНК, кодирующей мутант F204P, в сочетании с 375 мкл трансфекционного реагента Freestyle MAX. Трансфекционная плазмидная ДНК имела последовательность нуклеотидов, приведенную в SEQ ID NO: 4, в которой кодон TTC был заменен на CCT в положениях нуклеотидов 1733-1735, и, таким образом, кодировала мутант F204P. Трансфицированные клетки затем выдерживали в культуре в течение 96 ч, после чего клетки и среды собирали и объединяли. Клетки осаждали центрифугированием ($4000 \times g$, 20 мин), и супернатант сохраняли для очистки белка F204P (примерно 4,5 л).

Неочищенный супернатант концентрировали в 10 раз с использованием системы тангенциальной проточной фильтрации с пределом исключения 30 кДа (TFF) (Millipore Pellicon XL, Vimax 30, 200 мл пустого объема; площадь поверхности фильтра 50 см²) до конечного объема примерно 450 мл. Пермеат сохраняли для анализа на обнаружение белка F204P, прошедшего сквозь фильтр. Затем для ретентата проводили замену буфера с использованием 4 л буфера (10 мМ NaPO₄, 25 мМ NaCl, pH 7,2). Объем ретентата снова уменьшали примерно до 200 мл, затем сливали оставшийся в системе пермеат (пустой объем ~200 мл) и промывали систему с помощью примерно 50 мл буфера с получением конечного концентрированного продукта в объеме около 450 мл.

Аффинную колонку с анти-gHuPH20 получали при взаимодействии аффинно очищенного на антигене IgG кролика к gHuPH20 с CNBr-активированной сефарозой 4 Fast Flow (GEHealth, номер по каталогу 17-0981-01). Коротко, 0,7 г предварительно активированного порошка сефарозы 4 суспендировали в 1 мМ HCl в 10 мл стеклянной колонке в течение 30 мин, чтобы порошок набух. Раствор сливали из колонки и промывали 15 объемами геля (около 30 мл) холодного раствора 1 мМ HCl под действием силы тяжести. Колонку промывали 5 об. геля связывающего буфера (0,1 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl при pH 8,3). Далее в колонку было добавлено 5 мг IgG кролика к gHuPH20 в концентрации > 1,0 мг/мл в связывающем буфере при соотношении белок/гель 2-3 мг/мл геля. Колонку переворачивали и оставляли при 4°C на ночь. Проскок собирали для определения эффективности связывания. Гель промывали 2 об. геля связывающего буфера, а затем промывали и ресуспендировали в 1 М этаноламе, pH 9,5, в течение 2 ч при комнатной температуре, чтобы блокировать неиспользованные активированные сайты. Гель промывали 6 раз 5 об. геля на каждую промывку попеременно связывающим буфером и 0,1 М NaAc, 0,5 М NaCl, pH 4,5. Затем гель промывали 10 об. геля TBS (20 мМ трис-HCl, 0,15 М NaCl, pH 7,5). Была определена эффективность связывания (концентрация белка после 1 связывания/концентрация белка перед связыванием \times 100%). Антитело, связанное с гелем, хранили в TBS с 0,02% NaN₃ при 4°C.

Затем концентрированный продукт супернатанта наносили на анти-gHuPH20 аффинную колонку с скоростью приблизительно 5 мл/мин. Элюирование проводили в соответствии со стандартной методикой с использованием системы очистки GE™ АКТА FPLC (GE Healthcare, номер продукта по каталогу 18-1900-26), белок элюировали глициновым буфером с низким pH (0,1 М глицин-HCl, pH 2,5) фракциями 1 мл. Каждую фракцию сразу же нейтрализовали добавлением 100 мкл 1 М Трис, pH 7,5.

Элюированный белок анализировали с помощью разделения белковых полос в геле SDS-PAGE трис-глицин с градиентом 4-20%. В качестве стандартов молекулярной массы были использованы предварительно окрашенные стандарты MW SeeBlue®Plus2 (Life Technologies; номер по каталогу LC5925), и в качестве положительного контроля было использовано 50 нг gHuPH20 (как описано в Примере 1). Полиакриламидный гель окрашивали Instant Blue, чтобы обнаружить общий белок в каждой фракции. Чтобы подтвердить полосы PH20 на геле, гель перенесли на мембрану из PVDF (Invitrogen), которая была подвергнута анализу Вестерн-блот с использованием первичного антитела анти-PH20 кролика, полученного при помощи иммунизации кроликов gHuPH20, и вторичных HRP-антител козы против антител кролика (Calbiochem, Cat. No. DC03L).

Затем проскок от первоначального нанесения на аффинную колонку повторно наносили на колонку

два раза в связи с низкой емкостью аффинной колонки. Все фракции, содержащие белок, затем были объединены, в результате чего общий объем составил примерно 13 мл. Затем продукт диализовали в течение ночи против четырех литров буфера (10 mM NaPO₄, 140 mM NaCl, pH 7,2) с использованием кассеты для диализа Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 (20000 MWCO) емкостью 15 мл. Затем буфер заменяли и продукт повторно подвергали диализу против четырёх литров того же свежего буфера. Белок F204P затем концентрировали с использованием колонки Amicon Ultra Centrifugation (Millipore; 10,000 MWCO) до конечного объема приблизительно 450 мкл (10 мин при 4000×g).

2. Характеристика белка.

Очищенный белок был охарактеризован по его концентрации, активности и чистоте.

Для определения концентрации очищенного белка проводили количественный анализ ELISA, как описано в примере 7. Кроме того, активность гиалуронидазы определяли, как описано в примере 3. Концентрация белка после центрифугирования была оценена примерно на уровне 400 мкг/мл. Очищенный белок был также разделён на геле SDS-PAGE трис-глицин с градиентом 4-20%, который затем окрашивали Instant Blue. Результаты окрашивания показали, что белок представлял собой, по существу, единственный белок молекулярной массы приблизительно 63 кДа, аналогично контрольному гHuPH20. С помощью этого метода не было обнаружено заметного количества продуктов деградации. Приблизительный выход белка на различных временных точках и активность в процессе очистки описаны в табл. 14.

Таблица 14

Характеристика этапов очистки

Этап очистки	Объём (мл)	Анализ активности		Количественный анализ ELISA		Удельная активность (Ед/ мкг)
		Активность (Ед/мл)	Общая активность (Ед)	Концентрация белка (мкг/мл)	Общий белок (мкг)	
Супернатант	4500	2,66	11,700	0,046	207	56,5
Концентрация после TFF и замены буфера	450	42	18,900	0,4	178	105,9
Объединённые фракции 5-7 после АС (аффинная колонка), диализа и концентрирования – A ₂₈₀	0,45	11,741	5283	396	180	35,3

Чистоту очищенного белка определяли с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). Время элюции с колонки с обращенной фазой было, по существу, идентично наблюдаемому времени для рекомбинантной человеческой гиалуронидазы (HUB) и обеспечивало основную грубую оценку чистоты образца примерно 80-90%.

Пример 7. Количественное определение методом ELISA.

Количественный анализ PH20 или его вариантов проводили с применением ELISA, который захватывает белок, используя связывающее моноклональное антитело анти-гHuPH20. Конкретно, за один день до выполнения ELISA 96-луночные планшеты 4NBX покрывали иммобилизованным антителом (очищенное на белке G поликлональное анти-PH20 антитело кролика, полученное при помощи иммунизации кроликов гHuPH20; исходный раствор 1 мг/мл) при концентрации 1 мкг/мл в 100 mM фосфатного буфера (pH 7,2) в общем объеме 100 мкл на лунку. Планшеты хранили при 4°C в течение ночи. На следующий день планшеты промывали 5 раз 1×PBS в количестве 300 мкл/лунку с помощью устройства для промывки планшетов. После каждой промывки планшеты переворачивали на сухих бумажных полотенцах и постукивали. Затем планшеты блокировали 200 мкл PBS, содержащего Tween 20 (1×PBST), на лунку при комнатной температуре в течение 1 ч.

Стандарты и образцы добавляли в планшет. Для получения стандарта исходный раствор 1 мг/мл гHuPH20 (пример 1) был разведён до 50 мкг/мл в аналитическом HEPES буфере, pH 7,4 в качестве промежуточного раствора. Затем для получения стандартов раствор с концентрацией 50 мкг/мл разводили в двух повторностях в 360 мкл 0,5×PBST при концентрации 300 нг/мл для первого стандарта (первый ряд). Для других рядов стандартов добавляли по 240 мкл 0,5×PBST в каждую лунку и делали серийные разведения 1:3. Образцы супернатантов после трансфекции добавляли по 360 мкл на лунку в двух повторностях в первый ряд, и каждый из них также серийно разводили, как описано выше, в 0,5×PBST. Очищенные образцы добавляли в количестве 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали 5 раз 1×PBST по 300 мкл/лунку с использованием устройства для промывания планшетов. После каждой промывки планшеты сушили на бумажных полотенцах.

HRP-конъюгированные анти-PH20 антитела готовили для детектирования с использованием набора для конъюгации HRP (Pierce, Thermo-Fisher; номер по каталогу 31489). 1 мг очищенного на белке G по-

ликлонального антитела кролика, полученного с помощью иммунизации кроликов gNuPH20, разводили в 1 мл PBS и 1 мл 2× карбонатного буфера из набора. Далее к 1 мл указанного выше раствора антител добавляли 100 мкл пероксидазы и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем в вытяжном шкафу добавляли 10 мкл исходного раствора NaBH_4 и образец инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Для остановки реакции добавляли 20 мкл этаноламина и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. К полученному раствору добавляли 1/25 об. 5% человеческого сывороточного альбумина (0,1 мл шприц) с получением исходного реакционного раствора альбумина с концентрацией 2 мг/мл. Значение pH доводили до приблизительно 7,9 добавлением 250 мкл 1 М трис, pH 7,4. Концентрация исходного раствора составила 400 мкг/мл. Исходный раствор дополнительно разбавляли 1/10 PBS Tween 20 (0,05%), содержащим 0,5% человеческого сывороточного альбумина и консервантов, а затем стерильно фильтровали. Рабочий раствор хранили при 4°C или замораживали при -20°C.

Антитела детектировали с использованием HRP-конъюгированного анти-PH20 антитела, которое разводили в 1000 раз в 0,5×PBST. 100 мкл разбавленного раствора антитела добавляли в каждую лунку планшета и планшеты инкубировали еще в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали 5 раз 1×PBST по 300 мкл/лунку с использованием устройства для промывания планшетов. После каждой промывки планшеты сушили на бумажных полотенцах. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата TMB и через 5-10 мин останавливали реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Планшет считывали при OD_{450} .

Пример 8. Определение ферментативной активности PH20.

Ферментативная активность PH20 в образцах, таких как клеточные культуры, фракции очистки и очищенные растворы, определяли с помощью турбидиметрического анализа, который основан на образовании нерастворимого осадка, когда гиалуронан связывается с цетилпиридинхлоридом (CPC). Активность измеряли путем инкубирования PH20 с гиалуронаном в течение установленного периода времени (30 мин) и последующего осаждения непрореагировавшего гиалуронана добавлением CDC. Мутность полученного образца измеряли при 640 нм. Уменьшение мутности в результате ферментативной активности в отношении субстрата гиалуронана является мерой ферментативной активности PH20. Способ осуществляли с использованием калибровочной кривой, полученной с помощью анализа разведений рабочего эталонного стандарта PH20 (стандарт gNuPH20 получали, как описано в примере 1), и измерение активности пробы проводили по отношению к этой калибровочной кривой.

Разведения образца и стандартов были подготовлены в растворе для разведения ферментов (70 mM NaCl, 0,1% человеческий сывороточный альбумин [HSA], 0,67 г/л гидролизата желатина в 25 mM PIPES буфере, pH 5,5). Образцы разбавляли до соответствующей концентрации. Гиалуроновая кислота (HA, средняя молекулярная масса 20-50 кДа) от Lifecore Biomedical (Chaska, MN) также была подготовлена в виде раствора субстрата с концентрацией 1 мг/мл, содержащего 25 mM PIPES, 70 mM NaCl, pH 5,5. Равные количества двух указанных выше растворов смешивали для приготовления 1 мл реакционной смеси и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 4 мл раствора хлорида цетилпиридиния (CPC, 5,0 мг/мл). После кратковременного встряхивания на вортексе мутность образца смеси считывали при 640 нм и определяли активность в соответствии со стандартной кривой. Удельную активность (Ед/мг) рассчитывали как отношение активности фермента (Ед/мл) к концентрации белка (мг/мл).

Пример 9. Стабильность варианта F204P-PH20 в присутствии консерванта.

Чтобы подтвердить результаты скрининга, количество очищенного белка F204P, оцененное как 450 Ед/мл, как описано в примере 6, вводили в композицию с 10 mM фосфата натрия, pH 6,5, 120 mM NaCl, 10 mM метионина, 0,01% Pluronic F-68, 0,1% фенола и 0,15% м-крезола. В качестве контроля был приготовлен образец, который содержал gNuPH20 дикого типа в количестве, оцененном как примерно 450 ед/мл (получен, как описано в Примере 1), в той же композиции. Из каждого раствора композиции были приготовлены аликвоты по 0,5 мл и помещены в 2 мл флаконы USP типа I из боросиликатного стекла с пробкой из хлорбутиловой резины и алюминиевым колпачком. Флаконы инкубировали при 5°C, 30°C или 37°C. Пробы отбирали из инкубатора в различные моменты времени и измеряли ферментативную активность, как описано в примере 8.

Результаты измерений ферментативной активности приведены в табл. 15. Как видно из таблицы, контрольный gNuPH20 дикого типа демонстрировал быстрое снижение активности при инкубации при 37°C в присутствии фенольных консервантов. В отличие от этого мутант F204P не показал существенной потери активности в течение всего исследования. Результаты также показывают, что активность PH20 сохраняется после инкубации вплоть до 4 недель при 5 и 30°C по сравнению с активностью контрольного gNuPH20 дикого типа, не содержащего мутацию. Эти результаты подтверждают, что F204P выдерживает уровень консерванта ЕРВ (0,1% фенола и 0,15% м-крезола) и стабилен при 37°C в течение по меньшей мере до 6 дней и при 5 и 30°C в течение более одного месяца.

Стабильность гHuPH20 дикого типа и мутанта F204P, инкубированных с консервантом

ID	Относительная активность PH20 (%) при 5°C			Относительная активность PH20 (%) при 30°C			Относительная активность PH20 (%) при 37°C		
	T0	2 недели	4 недели	6 дней	2 недели	4 недели	2 дня	4 дня	6 дней
F204P	100	-	91,8	84,1	100	96,6	105	91,1	95,9
Контроль дикого типа	100	-	81,9	66,7	61,7	60,5	48,6	29,6	15,2

Пример 10. Стабильность варианта F204P-PH20 в совместной лекарственной форме с инсулином.

Вариант F204P PH20 испытывали на его стабильность в совместной лекарственной форме, содержащей аналог инсулина (инсулин аспарт или инсулин лизпро).

В испытанных совместных лекарственных формах инсулин лизпро был коммерческим продуктом (Insulin Lispro: Eli Lilly Humalog® (инсулин лизпро), 100 Ед/мл, партия A572364).

В испытываемых совместных лекарственных формах аналог инсулина аспарт являлся измененным препаратом инсулина аспарт, приготовленным при объединении 12 флаконов (10 мл каждый) коммерческого продукта (Insulin Aspart: Novo Nordisk, NovoRapid® (инсулин аспарт), партия XS60195), который затем концентрировали с использованием колоночного концентратора Amicon Ultracel-10 K до конечной концентрации, приблизительно в 5 раз превышающей первоначальную концентрацию. Аналог инсулина осаждали добавлением 1 М ацетата натрия, pH 5,3 и 30 мМ хлорида цинка (ZnCl₂, EMD, номер по каталогу ZX0065-1) в количестве 1/10 объема раствора белка. Раствор помещали на лед на 30 мин с последующим центрифугированием при 5600 об/мин в течение 20 мин в центрифуге Avanti J-E Centrifuge с бакетным ротором JS-5.3 (Beckman Coulter). Супернатант декантировали, а осадок повторно суспендировали и промывали раствором 20 мМ ацетата натрия, 2 мМ хлорида цинка, pH 5,5. Ресуспендированный раствор центрифугировали, как описано выше. Стадию промывки повторяли в общей сложности 5 раз. Конечную промывку проводили раствором 20 мМ ацетата натрия, pH 5,5, чтобы удалить все следы хлорида цинка. Полученную пасту белка растворяли в воде, содержащей 20 мМ HCl. После полного растворения добавляли 250 мМ трис, pH 10,7, до конечной концентрации трис 20 мМ. Значение pH полученного раствора доводили таким образом, чтобы получить композицию аналога инсулина, описанную ниже, а концентрацию белка доводили примерно до 15-20 мг/мл. Аналог инсулина, полученный таким образом, как правило, имел выход около 90% при остаточной концентрации консерванта, в 100 раз меньшей чем в исходном материале.

Коротко, было получены три лекарственных формы, каждая из которых содержит 600 единиц (Ед) PH20-F204P или гHuPH20 дикого типа (полученных, как описано в примере 1), и общее количество составило 6 лекарственных форм, как указано в табл. 16.

Таблица 16

Краткое описание лекарственных форм инсулина

ID	pH	Буфер		Модифици-катор	Антиоксидант	Металл	Сурфактант	Консервант		API		
		NaPO ₄	Трис/HCl	NaCl	Метилонин	Глицерин	Zn	F68	Фенол	m-Крезол	PH20 (Ед/мл)	Аналог (мг/мл)
F1. Хумалог + F204P	7,0 - 7,8	13,2 мМ				173,7 мМ	0,242 мМ			0,315%	600	3,5
F2. Хумалог + дикий тип	7,0 - 7,8	13,2 мМ				173,7 мМ	0,242 мМ			0,315%	600	3,5
F3. Аспарт + F204P	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%	0,10 0%	0,150%	600	3,5
F4. Аспарт + дикий тип	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%	0,10 0%	0,150%	600	3,5
F5. Аспарт + F204P	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%		0,315%	600	3,5
F6. Аспарт + дикий тип	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%		0,315%	600	3,5

Каждый раствор лекарственной формы разливали в виде 0,5 мл аликвот в 2 мл флаконы USP типа I из боросиликатного стекла с пробкой из хлорбутиловой резины и алюминиевым колпачком. Флаконы инкубировали при 5, 30 и 37°C. Пробы отбирали из инкубатора в заданные временные точки для измерения ферментативной активности, как описано в примере 8.

Результаты измерений ферментативной активности образцов, инкубированных при 37, 30 и 5°C, приведены в табл. 17-19 соответственно. При 37°C ферментативная активность образцов, содержащих гНuPH20 дикого типа (F2, F4 и F6), была почти полностью потеряна в течение двух дней инкубации. В отличие от этого, после 6 дней инкубации при 37°C лекарственные формы F3 и F5, которые содержали PH20-F204P, потеряли лишь около 10 и 30% ферментативной активности соответственно. PH20-F204P, введенный в лекарственную форму с коммерческим Хумалог (F1), потерял большую часть своей активности в течение 2 дней при 37°C, скорее всего, в связи с отсутствием NaCl в лекарственной форме.

Аналогичная тенденция для ферментативной активности ампул, инкубированных при 30°C, была отмечена для PH20-F204P и гНuPH20. Для лекарственных форм, которые содержат уровень консерванта ЕРА, различия между диким типом и F204P были существенными (табл. 17; F1 и F5 против F2 и F6). Когда концентрация консерванта была снижена до уровня ЕРВ (F3 и F4), F204P всё ещё превосходил гНuPH20 дикого типа по ферментативной активности, хотя обнаруживалась немного более высокая стабильность гНuPH20 по сравнению с условиями ЕРА. При уровнях консервантов ЕРА и ЕРВ PH20-F204P оказался способным сохранять свою активность до 14 дней при 30°C при 100 мМ NaCl, включенных в лекарственную форму.

Таблица 17

Ферментативная активность гНuPH20 дикого типа и мутанта F204P, инкубированных при 37°C

ID	Активность PH20 Ед/мл, (% остаточной активности)				
	Исходная активность	2 дня	4 дня	6 дней	2 недели
F1. Хумалог + F204P	583 (100%)	61 (10%)	15 (3%)	10 (2%)	-
F2. Хумалог дикий тип	439 (100%)	4 (1%)	-	-	-
F3. Аспарт + F204P	625 (100%)	613 (98%)	496 (79%)	570 (91%)	532 (85%)
F4. Аспарт дикий тип	566 (100%)	58 (10%)	24 (4%)	4 (1%)	-
F5. Аспарт + F204P	657 (100%)	484 (74%)	462 (70%)	478 (73%)	360 (55%)
F6. Аспарт дикий тип	596 (100%)	-1 (0%)	-	-	-

Таблица 18

Ферментативная активность гНuPH20 дикого типа и мутанта F204P, инкубированных при 30°C

ID	Активность PH20 Ед/мл, (% остаточной активности)			
	Исходная активность	6 дней	2 недели	4 недели
F1. Хумалог + F204P	583 (100%)	345 (59%)	250 (43%)	111 (19%)
F2. Хумалог + дикий тип	439 (100%)	1 (0%)	16 (4%)	-1
F3. Аспарт + F204P	625 (100%)	601(96%)	650(104%)	579 (93%)
F4. Аспарт + дикий тип	566 (100%)	428 (76%)	390 (69%)	277 (49%)
F5. Аспарт + F204P	657 (100%)	632 (96%)	655 (100%)	561 (85%)
F6. Аспарт + дикий тип	596 (100%)	145 (24%)	65 (11%)	9 (1.5%)

Ферментативная активность при 5°C

ID	Активность PH20 (Ед/мл) при 5° С		
	Исходная активность	2 недели	4 недели
F1. Хумалог + F204P	583	544	565
F2. Хумалог + дикий тип	439	428	404
F3. Аспарт + F204P	625	647	607
F4. Аспарт + дикий тип	566	580	496
F5. Аспарт + F204P	657	695	574
F6. Аспарт + дикий тип	596	583	519

Пример 11. Стабильность совместной лекарственной формы инсулина и V58R-PH20.

А. Стабильность V58R-PH20.

Вариант V58R PH20 экспрессировали в клетках CHO-S, как описано в примере 2 или 6, трансфицированных плазмидной ДНК, имеющей последовательность нуклеотидов, приведенную в SEQ ID NO: 4, и содержащей замену ко дона GTG на CGG в положениях нуклеотидов 1295-1297 и, тем самым, кодирующей мутант V58R. Мутант V58R испытывали на его стабильность в совместной лекарственной форме, содержащей инсулин аспарт (аналог инсулин аспарт, полученный, как описано в примере 10) и уровни консерванта в соответствии с EPA и EPB. Коротко, 4 лекарственные формы получали с содержанием PH20-V58R или гNuPH20 дикого типа 600 Ед (получены, как описано в примере 1), как указано в табл. 20. Лекарственные формы F1 и F2 имеют уровни консервантов EPB, в то время как лекарственные формы F3 и F4 имеют уровни консервантов EPA.

Таблица 20

Краткое описание лекарственных форм инсулина

ID	pH	Буфер		Модификатор тоничности	Антиоксидант	Металл	Сульфатанг	Консервант			API	
		NaPO ₄	Трис/HCl					NaCl	Метионин	Глицерин		Zn
F1. Аспарт + V58R	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%	0,100 %	0,150 %	600	3,5
F2. Аспарт + гNuPH20 дикий тип	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%	0,100 %	0,150 %	600	3,5
F3. Аспарт + V58R	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%		0,315 %	600	3,5
F4. Аспарт + гNuPH20 дикий тип	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010%		0,315 %	600	3,5

Раствор каждой лекарственной формы разливали в виде 0,5 мл аликвот в 2 мл флаконы USP типа I из боросиликатного стекла с пробкой из хлорбутиловой резины и алюминиевым колпачком. Флаконы инкубировали при 30 и 37°C. Пробы отбирали из инкубатора в заданные временные точки для измерения ферментативной активности, как описано в примере 8.

Результаты измерений ферментативной активности для образцов, инкубированных при 37 и 30°C, приведены в табл. 21 и 22. При 37°C ферментативная активность образцов, содержащих гNuPH20 дикого типа (F2 и F4), была почти полностью утрачена в течение двух дней инкубации. В отличие от этого, после 6 дней инкубации при 37°C лекарственные формы F1 (EPB) и F3 (EPA), содержащие V58R-PH20, потеряли лишь около 25 и 40% активности соответственно. При 30°C ферментативная активность образцов, содержащих гNuPH20 дикого типа, также резко снизилась в присутствии уровней консервантов EPA или EPB в течение одного месяца инкубации, хотя обнаружилась немного менее существенная потеря активности в присутствии уровня консервантов EPB. В противоположность этому для V58R-PH20 не было обнаружено никакой потери ферментативной активности для испытываемых лекарственных форм вплоть до 1 месяца.

Таблица 21

Ферментативная активность гHuPH20 дикого типа и мутанта V58R, инкубированных при 37°C

Композиция	Активность PH20 Ед/мл			
	Исходная активность	2 дня	4 дня	6 дней
F1. Аспарт + V58R	1350	1099	1094	1006
F2. Аспарт + гHuPH20 дикого типа	677	53	-3	-
F3. Аспарт + V58R	1189	793	581	464
F4. Аспарт + гHuPH20 дикого типа	744	12	-9	-

Таблица 22

Ферментативная активность гHuPH20 дикого типа и мутанта V58R, инкубированных при 30°C

Композиция	Активность PH20 Ед/мл		
	Исходная активность	2 недели	4 недели
F1. Аспарт + V58R	1350	1368	1208
F2. Аспарт + гHuPH20 дикого типа	677	422	256
F3. Аспарт + V58R	1189	1228	1171
F4. Аспарт + гHuPH20 дикого типа	744	21	-5

В. Сравнение стабильности F204P и V58R.

Варианты PH20 V58R и F204P сравнивали по их стабильности в совместных лекарственных формах, содержащих инсулин аспарт (аналог инсулина аспарт, полученный, как описано в примере 10) и уровни консервантов в соответствии с ЕРА и ЕРВ. Коротко, было получено восемь лекарственных форм, как указано в табл. 23. Лекарственные формы F1-F4 содержат уровни консервантов ЕРВ, в то время как лекарственные формы F5-F8 содержат уровни консервантов ЕРА. Лекарственные формы F3 и F4 и лекарственные формы F7 и F8 были идентичны и представляют собой контрольные композиции дикого типа, используемые для исследований ЕРВ или ЕРА соответственно.

Таблица 23

Краткое описание композиций инсулина

ID	pH	Буфер		Модификатор тоничности	Антиоксидант	Металл	Сульфатанг	Консервант			API	
		NaPO ₄	Трис/НСl					NaCl	Метионин	Глицерин	Zn	F68
F1. Аспарт + V58R	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %	0,100 %	0,150%	600	3,5
F2. Аспарт + F204P	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %	0,100 %	0,150%	600	3,5
F3. Аспарт + гHuPH20 дикого типа (1)	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %	0,100 %	0,150%	600	3,5
F4. Аспарт + гHuPH20 дикого типа (2)	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %	0,100 %	0,150%	600	3,5
F5. Аспарт + V58R	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %		0,315%	600	3,5
F6. Аспарт + F204P	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %		0,315%	600	3,5
F7. Аспарт + гHuPH20 дикого типа (1)	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %		0,315%	600	3,5
F8. Аспарт + гHuPH20 дикого типа (2)	7,3		30 мМ	100 мМ	5 мМ			0,010 %		0,315%	600	3,5

Каждый раствор лекарственной формы разливали в виде 0,5 мл аликвот в 2 мл флаконы USP типа I из боросиликатного стекла с пробкой из хлорбутиловой резины и алюминиевым колпачком. Флаконы инкубировали при 30 и 37°C. Пробы отбирали из инкубатора в заданные временные точки для измерения ферментативной активности, как описано в примере 8.

Результаты показывают, что процент активности гиалуронидазы в испытываемых лекарственных формах после предварительной инкубации при 37°C был немного выше у обоих мутантов PH20, когда композиция содержала уровень консервантов EPB, а не EPA. В то время как процент остаточной активности был выше 80% для обоих испытанных мутантов после 6 дней инкубации в лекарственных формах, содержащих уровни консервантов EPB, это значение было меньше в присутствии уровней консервантов EPA. Например, остаточная активность на 6 день при уровнях консервантов EPA была немного меньше чем 80%, после 6 дней для F204P-PH20, в то время как это значение составило только около 40% для V58R-PH20. Таким образом, результаты также показывают, что при температуре 37°C V58R-PH20 несколько менее устойчив, чем F204P-PH20, в частности в лекарственной форме с уровнем консервантов EPA. После инкубации при 30°C в течение не менее недели F204P-PH20 и V58R-PH20 были стабильными и проявили почти 100% от первоначальной активности в присутствии уровней консервантов как EPA, так и EPB. В отличие от этого, гHuPH20 продемонстрировал лишь около 40% от своей первоначальной активности после 4 недель при 30°C в присутствии уровня консервантов EPB, а в присутствии уровня консервантов EPA после 4 недель при 30°C вообще не продемонстрировал обнаруживаемой активности.

Пример 12. Экспрессия F204P-PH20 с использованием лентивирусного экспрессионного вектора.

Был сконструирован лентивирусный экспрессионный вектор PLV-EF1A-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd, содержащий кодон-оптимизированную кДНК мутантной гиалуронидазы F204P-PH20. Последовательность PLV-EF1A-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd приведена в SEQ ID NO: 925. Вектор PLV-EF1A-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd содержит ген устойчивости к ампициллину (AmpR), расположенный в положениях нуклеотидов 8611-9471, промотор EFla в положениях от 1933 до 2327, IRES в положениях 4786-5370, GFP-Bsd в положениях 5394-6527 и нуклеотидную последовательность, кодирующую F204P-PH20, в положениях 3369-4781.

Лентивирус получают, как описано в Bandaranayake et al. ((2011) *Nucleic Acids Research*, 39:e143). Коротко, клетки 293T (ATCC) культивировали при плотности 6×10^6 клеток в 10 см культуральных чашках. После 24 ч в 1,5 мл Opti-MEM (Life Technologies) смешивали 6 мкг psPAX2 (SEQ ID NO: 926; номер плазмиды на Addgene 12260), 3 мкг PMD2.G (SEQ ID NO: 927; номер плазмиды на Addgene 12259) и 9 мкг лентивирусной векторной плазмиды PLV-EF1A-PH20(F204P)-IRES-GFP-Bsd. В 1,5 мл Opti-MEM (Life Technologies) разводили 45 мкл Lipofectamine 2000 (LF2000; Life Technologies). ДНК и LF2000 осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, чтобы дать ДНК и липидам образовать комплексы. В то же время культуральную среду, в которой инкубировали клетки в течение ночи, заменяли на 5,0 мл среды DMEM + 10% FBS, без антибиотиков. Смесь объёмом 3,0 мл, содержащую комплексы ДНК-EP2000, добавляли к клеткам 293T. Среду, содержащую комплексы fHK-LF2000, заменяли на 10 мл полной среды через 12-16 ч после трансфекции. Супернатант собирали через 48 ч после трансфекции и переносили среду в полипропиленовую пробирку для хранения. Содержащую вирус среду центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеток 293T, которые были захвачены во время сбора. Супернатант осторожно переносили в стерильную полипропиленовую пробирку для хранения.

Клетки CHO-S (Invitrogen) выращивали в среде CHO-S (Invitrogen) при перемешивании при 120 об/мин при 37°C и 5% CO₂ в вентилируемых шейкерных колбах объёмом 125 мл (Nalgene). Для трансдукции клетки CHO-S вносили в лунки шестилуночного планшета в количестве 2×10^6 клеток на лунку в 2 мл среды CHO-S, содержащей гексадиметринбромид в конечной концентрации 4 мкг/мл (Polybrene; SIGMA). Вирус добавляли в каждую лунку при множественности инфекции (MOI) 10 и клетки инкубировали при встряхивании (120 об/мин) при 37°C и 5% CO₂ в течение 6 ч. Затем клетки собирали и осаждали центрифугированием с низкой скоростью (500×g, 5 мин). Среду после трансдукции удаляли и заменяли на 10 мл свежей среды CHO-S (Invitrogen) с добавлением GlutaMax (50 мл/л) и переносили в колбу T-25. Через три дня после инфицирования в питательную среду добавляли бластицидин (Invitrogen) в концентрации 1 мкг/мл. Среду регулярно заменяли через 3-4-дневные интервалы и клетки переносили в колбу T75 для наращивания. Через две недели после первичной инфекции клетки выросли для шейкерной колбы, и их поддерживали в культуре в среде, содержащей 1 мкг/мл бластицидина. Белок F204P-PH20, который секретировался в среду CHO-S, собирали и очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием аффинной колонки анти-гHuPH20, как описано в примере 6, получая белок в стандартном буфере API (10 mM гистидина, 130 mM NaCl, pH 6,5).

Пример 13. Анализ вторичной структуры и температура плавления.

Вторичная структура и температура плавления варианта F204P PH20 были определены в сравнении с диким типом (гHuPH20 получали, как описано в примере 1) для дальнейшей оценки устойчивости варианта. Вторичная структура была протестирована с помощью кругового дихроизма. Для спектрального измерения CD был использован прибор Jasco J-810-150S, оснащённый PTC-424S, а спектры CD собирали

с помощью Spectra Manager (версия 1.5, Jasco). Настройки прибора и методика сбора данных описаны в табл. 24.

Таблица 24

Условия работы при CD-спектроскопии

Параметры	Условия
Скорость потока азота	25 фут ³ /ч
Температура образца	30-75 °С
Концентрация образца	Примерно 0,1 мг/мл
Длина ячейки	1 мм
Длина волны	220 нм
Шаг данных	1 °С
Время задержки	60 секунд
Изменение температуры	1 °С/мин
Чувствительность	Стандартная
Отклик	4 секунды
Ширина полосы	1 нм

1. Подготовка и измерение образца.

Было подготовлено 200 мкл образца белка с концентрацией 0,1 мг/мл, разведенного в буфере McIlvaine (McIlvaine (1921) JBC 49: 183) с рН, доведенным до 6,5. Также были получены серии образцов варианта F204P с разнообразными значениями рН, доведёнными с помощью буфера McIlvaine, в диапазоне рН от 5,0 до 7,5, как указано в табл. 25. Кроме того, были получены образцы с различными концентрациями NaCl в диапазоне от 17,5 до 140 мМ, как указано в табл. 26. Образцы фильтровали с использованием шприца с фильтром с диаметром пор 0,2 мкм перед измерением. Подобные образцы были получены для гHuPH20. Затем 200 мкл образца переносили в прямоугольную кювету, имеющую ширину 1 мм, и помещали в спектрополяриметр Jasco J-810. CD-спектры образцов были собраны в условиях, описанных в табл. 20. Температура плавления (T_m) была рассчитана с использованием Spectra Manager (v 1.5, Jasco) из спектральной интенсивности CD, измеренной в интервале температур от 30 до 75°С. Кюветы очищали средством для очистки Chromerge® (C577-12, Fisher Scientific) между внесением индивидуальных образцов и после измерения.

Таблица 25

рН и концентрация образца

Целевой рН	Наблюдаемый рН	F204P (мкл)	Буфер (мкл)	Концентрация F204P (мг/мл)
5,0	4,92	25	175	0,1
5,5	5,38	25	175	0,1
6,0	5,99	25	175	0,1
6,5	6,49	25	175	0,1
7,0	7,00	25	175	0,1
7,5	7,5	25	175	0,1

Таблица 26

Концентрация натрия в образцах при рН 6,5

Целевая концентрация NaCl (мМ)	NaCl, 2,8 М (мкл)	F204P (мкл)	Буфер с рН 6,5 (мкл)	Концентрация F204P (мг/мл)
17,5	0,00	25	175	0,1
50,0	2,32	25	172,7	0,1
75,0	4,11	25	170,9	0,1
100,0	5,89	25	169,1	0,1
140,0	8,75	25	166,3	0,1

2. Результаты.

Результаты показывают, что вторичная структура F204P похожа на гHuPH20. Круговой дихроизм показал, что с повышением температуры наблюдалось изменение поглощения. Распределение T_m в зависимости от рН было сравнимо для F204P и гHuPH20, и самая высокая T_m для каждого белка была измерена при рН между 5,5 и 6,0. Результаты, однако, показали, что T_m варианта F204P была примерно на 9°С выше для всех протестированных диапазонов по сравнению с гHuPH20 дикого типа. Этот результат показал, что мутант F204P более устойчив к условиям тепловых воздействий. Полученные результаты показывают, что в зависимости от концентрации соли F204P и гHuPH20 дикого типа проявляют более высокие T_m при более высокой концентрации соли, что показывает, что для обоих белков предпочтительна высокая концентрация соли.

Пример 14. Оценка ферментативной активности в анализе внутрикожной дисперсии трипанового синего.

Распространяющую активность варианта F204P PH20 оценивали с помощью анализа распростране-

ния красителя *in vivo*. Коротко, очищенный вариант F204P PH20 (полученный, как описано в примере 12) и гHuPH20 дикого типа (полученный, как описано в примере 1) получали в виде лекарственных форм в буфере API (10 мМ гистидина, 130 мМ NaCl, pH 6,5) в концентрации 10000 Ед/мл. Исходные растворы были дополнительно разбавлены до трех целевых концентраций 1000, 100 и 10 Ед/мл серийными разведениями 1:10 в буфере API. Очищенные белки (гHuPH20 или F204P-PH20) разводили 1:1 0,4% трипановым синим (0,4% жидкий раствор; номер по каталогу 15250, Invitrogen), чтобы получить конечные концентрации белка 5, 50 и 500 Ед/мл, каждая из которых содержит 0,2% трипанового синего. Также была приготовлена контрольная жидкость (буфер API). В исследовании использовали сорок две (42) гомозиготные самки мышей NCr nu/nu по шесть мышей в каждой группе, как указано в табл. 27.

Таблица 27

Краткое описание групп для исследования распространения красителя

Группа	№ мышей	Тип теста	Финальная доза трипанового синего (Ед/мл)	Трипановый синий	Объем введения (мл)
1	6	Контроль	0	0,2%	0,04
2	6	гHuPH20	5	0,2%	0,04
3	6	гHuPH20	50	0,2%	0,04
4	6	гHuPH20	500	0,2%	0,04
5	6	F204P-PH20	5	0,2%	0,04
6	6	F204P-PH20	50	0,2%	0,04
7	6	F204P-PH20	500	0,2%	0,04

40 мкл образца вводили одной внутривенной инъекцией. Площадь распространения красителя измеряли через 2,5, 5, 10, 15 и 20 мин после инъекции и делали фотографические изображения путём фотографирования места инъекции с помощью цифровой камеры Nikon D90 с 60 мм высококачественной микролинзой.

Для точного позиционирования камеры на заранее определенном расстоянии от зоны окрашивания трипановым синим на животном был использован лазерный дальномер (Leica D3). Площадь окрашивания была определена с использованием Image-Pro Analyzer 7.0 (MediaCybernetics, Inc). Рассчитанные области были выражены в мм².

Результаты представлены в табл. 28. Результаты показывают, что распространяющая активность варианта F204P PH20 была, по существу, идентична распространяющей активности гHuPH20. Возможность увеличения площади распространения красителя зависит от дозы, при этом оба белка имеют наибольшую активность при 500 Ед/мл. Результаты также показали, что площадь распространения красителя возрастает со временем после внутривенной инъекции. Области распространения красителя при использовании гHuPH20 и F204P-PH20 были значительно больше, чем области распространения красителя при использовании контроля ($p < 0,05$) во всех временных точках и при всех концентрациях (5, 50 и 500 Ед/мл), за исключением гHuPH20 при самой низкой концентрации (5 Ед/мл). При сравнении друг с другом гHuPH20 и F204P-PH20 показали сходные эффекты распространения, хотя была обнаружена значительная разница в распространении между двумя группами при 5 и 500 Ед/мл, но не при 50 Ед/мл. В целом, результаты показывают, что гHuPH20 и F204P-PH20 обеспечили статистически значимое увеличение области распространения красителя по сравнению с контролем при введении носителя.

Таблица 28

Распространение трипанового синего

Группа	Площадь (мм ²)					
	Среднее (n=6)	2,5 мин	5 мин	10 мин	15 мин	20 мин
1: Контроль		37,44 ± 2,81	38,16 ± 3,33	43,71 ± 2,12	45,70 ± 2,38	48,77 ± 2,14
2: гHuPH20 (5 Ед/мл)		36,68 ± 2,83	42,31 ± 2,57	45,41 ± 2,75	46,72 ± 3,35	49,61 ± 2,97
3: гHuPH20 (50 Ед/мл)		39,24 ± 1,20	44,90 ± 1,44	46,96 ± 1,70	50,08 ± 2,07	53,50 ± 1,59
4: гHuPH20 (500 Ед/мл)		44,72 ± 1,35	50,21 ± 1,92	57,47 ± 1,29	59,77 ± 1,25	57,17 ± 3,28
5: F204P (5 Ед/мл)		39,65 ± 1,53	46,09 ± 2,73	48,07 ± 1,43	52,54 ± 2,01	54,11 ± 1,01
6: F204P (50 Ед/мл)		38,10 ± 1,92	47,07 ± 2,12	51,48 ± 2,14	55,24 ± 1,90	58,34 ± 2,89
7: F204P (500 Ед/мл)		46,58 ± 1,67	54,06 ± 2,52	58,96 ± 1,85	64,37 ± 1,72	64,44 ± 2,17

Пример 15. Оценка ферментативной активности по времени восстановления кожного барьера.

Активность F204P-PH20 оценивали и сравнивали с гHuPH20, измеряя количество времени, необходимое для восстановления кожного барьера после внутривенного введения гиалуронидазы. Восстанов-

ление кожи оценивали путем сравнения продолжительности распространяющей активности гиалуронидазы, что оценивали путем мониторинга площади диффузии 0,4% трипанового синего в течение длительного времени. Белки, используемые в исследовании, представляли собой очищенный вариант F204P PH20 (получен, как описано в примере 12) и гHuPH20 дикого типа (получен, как описано в примере 1) в буфере API (10 мМ гистидина, 130 мМ NaCl, pH 6,5). В качестве контроля был использован носитель (буфер API). В исследовании использовали самцов гомозиготных мышей NCg nu/nu, по три животных на временную точку, в общей сложности было использовано пятнадцать мышей на группу, как указано в табл. 29.

Таблица 29

Краткое описание групп для исследования восстановления кожного барьера					
Группа	№ мышей	Временная точка (ч)	Тип теста	Финальная доза (Ед/мл)	Объем введения (мл)
1	15	0,5; 1; 4; 24; 48	Контроль	0	0,04
2	15	0,5; 1; 4; 24; 48	гHuPH20	100	0,04
3	15	0,5; 1; 4; 24; 48	F204P	100	0,04

Во временной точке исследования 0 все мыши получали две внутрикожные дозы контрольного носителя или гHuPH20 или F204P-PH20 в количестве 100 Ед/мл в 0,04 мл. Контрольный и тестируемый образцы вводили в левый и правый бок каждого животного (правый, R; левый, L). Места инъекции были отмечены несмываемым маркером. Краситель трипановый синий (0,4% жидкий раствор; 15250, Invitrogen) вводили в объеме 0,04 мл внутрикожной инъекцией в то же место инъекции через 0,5; 1; 4; 24 и 48 ч после инъекции исследуемого вещества или контроля. Через 5 и 20 мин после инъекции трипанового синего площадь красителя в месте инъекции измеряли с помощью цифровой визуализации, как описано в примере 14.

Результаты приведены в табл. 30. Результаты показывают, что область распространения красителя, измеренная в различные моменты времени после введения тестируемого вещества или контроля, имела статистически значимое увеличение через 30 мин и через 1 ч после инъекции гHuPH20 или F204P-PH20.

Через 4 ч после введения ферментов, однако, не было обнаружено статистически значимого увеличения площади распространения красителя по сравнению с контролем. Кроме того, не наблюдалось статистически значимых различий в площади распространения красителя между группами гHuPH20 и F204P-PH20. Таким образом, продолжительности распространяющей активности для гHuPH20 и F204P были схожи, что показывает, что гHuPH20 и F204P-PH20 сравнимы по своей активности *in vivo*.

Таблица 30

Восстановление кожи

Временная точка	Минут после инъекции	Носитель	гHuPH20	F204P-PH20
30	5	49,96 ± 2,05	80,84 ± 8,03	80,76 ± 4,46
	20	64,42 ± 2,49	94,55 ± 7,09	95,75 ± 5,18
1 час	5	58,01 ± 3,21	82,56 ± 6,40	77,11 ± 3,18
	20	65,19 ± 6,21	96,19 ± 6,39	91,45 ± 1,73
4 час	5	52,10 ± 3,47	67,19 ± 2,39	67,33 ± 3,93
	20	57,69 ± 3,92	81,15 ± 4,45	82,21 ± 4,14
24 час	5	49,87 ± 3,25	59,01 ± 2,15	54,91 ± 3,54
	20	57,15 ± 3,47	67,65 ± 2,27	62,91 ± 3,30
48 час	5	53,64 ± 2,99	53,53 ± 4,88	55,64 ± 7,19
	20	61,57 ± 4,02	66,33 ± 4,12	63,11 ± 5,97

Пример 16. *In vivo* фармакокинетика F204P-PH20 по сравнению с гHuPH20.

Фармакокинетику (PK) гHuPH20 и F204P-PH20 сравнивали после внутривенного введения в хвостовую вену путем измерения уровней гиалуронидазы в плазме с течением времени после введения. Белки, используемые в исследовании, представляли собой очищенный вариант F204P PH20 (получен, как описано в примере 12, концентрация партии 1,02 мг/мл) и гHuPH20 дикого типа (получен, как описано в примере 1, концентрация партии 0,95 мг/мл) в буфере API (10 мМ гистидина, 130 мМ NaCl, pH 6,5). Белки были приготовлены в концентрации 0,087 мг/мл в буфере API для дозы объемом примерно 5 мл. Животное, которому не вводили белок, было использовано в качестве контроля (контроль до введения дозы). В исследовании были использованы сорок два (42) самца мышей CD-1 (~20-30 г) по шесть животных в группе, как указано в табл. 31.

Фармакокинетика однократной внутривенной дозы гHuPH20 или F204P-PH20

Группа	Число животных (№)	Тип теста	Доза (мг/кг)	Объём дозы (мл/кг)	Эвтаназия
1	6 (№ 1-6)	Без обработки	N/A	N/A	До введения дозы
2	6 (№ 7-12)	гHuPH20	0,433	5	1 мин
3	6 (№ 13-18)	гHuPH20	0,433	5	5 ± 1 мин
4	6 (№ 19-24)	гHuPH20	0,433	5	10 ± 2 мин
5	6 (№ 25-30)	F204P-PH20	0,433	5	1 мин
6	6 (№ 21-36)	F204P-PH20	0,433	5	5 ± 1 мин
7	6 (№ 37-42)	F204P-PH20	0,433	5	10 ± 2 мин

Мышам внутривенно вводили 0,433 мг/кг гHuPH20 или F204P-PH20 путем инъекции в хвостовую вену. Образцы крови были получены от животных через 1, 5 и 10 мин после введения. Для получения плазмы образцы крови были получены путем терминального кровотечения (пункции сердца) и собраны в пробирки для сбора крови, содержащие антикоагулянт ЭДТА. Образцы крови центрифугировали при 500 г в течение 10 мин, после чего плазму удаляли и замораживали при -80°C до тех пор, пока она не использовалась для оценки активности гиалуронидазы с помощью микротурбидиметрического анализа, описанного в примере 8.

Результаты представлены в табл. 32. Результаты показывают, что активность гиалуронидазы не обнаружена в плазме перед введением гиалуронидазы. Через 1 мин после введения гиалуронидазы гHuPH20 или F204P-PH20 детектировали высокую активность гиалуронидазы в плазме, которая является схожей для обеих групп. Со временем активность гиалуронидазы быстро снижается в обеих группах, хотя активность гиалуронидазы в плазме детектируется через 10 мин после введения. Через 5 и 10 мин после введения активность гиалуронидазы в плазме животных, получавших F204P-PH20, была выше, чем у животных, получавших гHuPH20. Это показывает, что F204P-PH20 проявляет несколько большую активность в течение длительного периода времени и, следовательно, обладает большим временем полувыведения *in vivo*, чем гHuPH20.

Таблица 32

Активность гHuPH20 и F204P-PH20 (Ед/мл) в мышинной плазме K₂ЭДТА

	Временная точка (мин)							
	До введения		1 минута		5 минут		10 минут	
Белок	Животное №	Ед/мл	Животное №	Ед/мл	Животное №	Ед/мл	Животное №	Ед/мл
гHuPH20	1	BQL	7	235 ^a	13	18,3	19	3,76
	2	BQL	8	13,5	14	7,70	20	3,70
	3	BQL	9	278	15	8,85	21	2,64
	4	BQL	10	328	16	10,5	22	2,70
	5	BQL	11	356	17	12,8	23	2,36
	6	BQL	12	287	18	18,0	24	2,80
F204P-PH20	1	BQL	25	249	31	48,0	37	11,5
	2	BQL	26	223	32	21,6	38	11,4
	3	BQL	27	246	33	38,4	39	10,1
	4	BQL	28	246	34	38,6	40	12,2
	5	BQL	20	0,696	35	38,2	41	10,8
	6	BQL	30	257	36	28,5	42	10,2

BQL - ниже предела количественного определения <0,625 Ед/мл при минимальном необходимом разбавлении

^a – гемолизированный

Поскольку некоторые модификации изобретения будут очевидны специалистам в данной области, предполагается, что настоящее изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид PH20, включающий аминокислотную замену в немодифицированном полипептиде PH20, где

немодифицированный полипептид PH20 состоит из последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 3, 7 и 32-66;

по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой замену в аминокислотной позиции, выбранной из 10, 12, 20, 22, 26, 34, 36, 46, 50, 52, 58, 68, 70, 74, 82, 83, 84, 86, 97, 127, 131, 138, 142, 143, 144, 166, 169, 174, 193, 195, 196, 204, 205, 206, 213, 234, 237, 238, 240, 249, 261, 267, 277, 279, 291, 309, 310, 314, 315, 317, 318, 347, 367, 375, 376, 399, 401, 407, 416, 419, 421, 431, 433, 439, 440, 443 и 445 со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3, при условии, что если модифицированный полипептид PH20 содержит только одну аминокислотную замену, эта замена не соответствует аминокислотным заменам V12A, N131A или E249Q со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3;

соответствующие позиции аминокислот идентифицируют с помощью выравнивания полипептида PH20 с полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3;

модифицированный полипептид PH20 проявляет повышенную стабильность в условиях, при которых происходит денатурация белка, по сравнению с немодифицированным полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену; где по меньшей мере одна из аминокислотных замен придает повышенную стабильность; и

повышенная стабильность проявляется как повышенная гиалуронидазная активность в условиях, при которых происходит денатурация белка, по сравнению с гиалуронидазной активностью немодифицированного полипептида PH20, не содержащего аминокислотную замену, в тех же денатурирующих условиях, и активности сравнивают в одинаковых условиях.

2. Модифицированный полипептид PH20 по п.1, где аминокислотная замена (замены) представляет собой замену в немодифицированном полипептиде PH20, состоящем из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NOS: 3 или 32-66.

3. Модифицированный полипептид PH20 по п.1 или 2, где условия, при которых происходит денатурация белка, включают присутствие фенольного консерванта.

4. Модифицированный полипептид PH20 по п.3, где

модифицированный полипептид PH20 проявляет более чем 110% гиалуронидазной активности в присутствии фенольного консерванта по сравнению с немодифицированным полипептидом PH20, не содержащим аминокислотную замену (замены); или

модифицированный полипептид PH20 проявляет по меньшей мере 15, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большую гиалуронидазную активность в присутствии фенольного консерванта (консервантов) по сравнению с его гиалуронидазной активностью в отсутствие фенольного консерванта.

5. Модифицированный полипептид PH20 по п.3 или 4, где модифицированный полипептид PH20 является стабильным в присутствии эффективного против микроорганизмов количества одного или более фенольных консервантов, где эффективное против микроорганизмов количество представляет собой общее количество одного или более фенольных консервантов в виде процента концентрации по массе (мас./об.), который составляет от 0,05 до 0,6%, от 0,1 до 0,4%, от 0,1 до 0,3%, от 0,15 до 0,325%, от 0,15 до 0,25%, от 0,1 до 0,2%, от 0,2 до 0,3% или от 0,3 до 0,4%, включая граничные значения.

6. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.3-5, где фенольный консервант выбран из одного или более веществ, выбранных из фенола, метакрезола (м-крезола), бензилового спирта и парабена.

7. Модифицированный полипептид PH20 по п.6, где

консервантом является парабен, который представляет собой метилпарабен или пропилпарабен, или

консервантом является фенольный консервант, который представляет собой м-крезол, фенол или м-крезол и фенол.

8. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.1-7, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замен на G в позиции, соответствующей позиции 10; K в позиции, соответствующей позиции 12; S в позиции, соответствующей позиции 20; T в позиции, соответствующей позиции 22; M в позиции, соответствующей позиции 26; W в позиции, соответствующей позиции 34; N в позиции, соответствующей позиции 36; L в позиции, соответствующей позиции 46; M в позиции, соответствующей позиции 50; T в позиции, соответствующей позиции 52; S в позиции, соответствующей позиции 52; C в позиции, соответствующей позиции 58; K в позиции, соответствующей позиции 58; R в позиции, соответствующей позиции 58; N в позиции, соответствующей позиции 58; Y в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 58; H в позиции, соответствующей позиции 58; P в позиции, соответствующей позиции 68; V в позиции, соответствующей позиции 70; E в позиции, соответствующей позиции 74; L в позиции, соответствующей позиции 82; N в позиции, соот-

ветствующей позиции 82; V в позиции, соответствующей позиции 83; Q в позиции, соответствующей позиции 83; S в позиции, соответствующей позиции 83; G в позиции, соответствующей позиции 83; N в позиции, соответствующей позиции 84; A в позиции, соответствующей позиции 86; K в позиции, соответствующей позиции 86; E в позиции, соответствующей позиции 97; L в позиции, соответствующей позиции 97; R в позиции, соответствующей позиции 127; R в позиции, соответствующей позиции 131; L в позиции, соответствующей позиции 138; K в позиции, соответствующей позиции 142; N в позиции, соответствующей позиции 142; P в позиции, соответствующей позиции 142; S в позиции, соответствующей позиции 142; T в позиции, соответствующей позиции 142; G в позиции, соответствующей позиции 143; K в позиции, соответствующей позиции 143; T в позиции, соответствующей позиции 144; Q в позиции, соответствующей позиции 166; T в позиции, соответствующей позиции 166; L в позиции, соответствующей позиции 169; G в позиции, соответствующей позиции 174; N в позиции, соответствующей позиции 174; Q в позиции, соответствующей позиции 193; T в позиции, соответствующей позиции 195; N в позиции, соответствующей позиции 195; E в позиции, соответствующей позиции 196; R в позиции, соответствующей позиции 196; P в позиции, соответствующей позиции 204; A в позиции, соответствующей позиции 205; E в позиции, соответствующей позиции 205; I в позиции, соответствующей позиции 206; A в позиции, соответствующей позиции 213; M в позиции, соответствующей позиции 234; T в позиции, соответствующей позиции 237; H в позиции, соответствующей позиции 238; Q в позиции, соответствующей позиции 240; V в позиции, соответствующей позиции 249; A в позиции, соответствующей позиции 261; K в позиции, соответствующей позиции 261; T в позиции, соответствующей позиции 267; K в позиции, соответствующей позиции 277; H в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 279; V в позиции, соответствующей позиции 291; E в позиции, соответствующей позиции 309; Q в позиции, соответствующей позиции 310; Y в позиции, соответствующей позиции 314; Y в позиции, соответствующей позиции 315; N в позиции, соответствующей позиции 317; W в позиции, соответствующей позиции 317; D в позиции, соответствующей позиции 318; G в позиции, соответствующей позиции 347; A в позиции, соответствующей позиции 367; R в позиции, соответствующей позиции 375; R в позиции, соответствующей позиции 376; V в позиции, соответствующей позиции 399; E в позиции, соответствующей позиции 401; A в позиции, соответствующей позиции 407; L в позиции, соответствующей позиции 416; K в позиции, соответствующей позиции 419; H в позиции, соответствующей позиции 421; E в позиции, соответствующей позиции 431; T в позиции, соответствующей позиции 433; V в позиции, соответствующей позиции 433; C в позиции, соответствующей позиции 439; P в позиции, соответствующей позиции 440; G в позиции, соответствующей позиции 443; и N в позиции, соответствующей позиции 445, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

9. Модифицированный полипептид PH20 по п.8, включающий по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замен на T в позиции, соответствующей позиции 52, K в позиции, соответствующей позиции 58, R в позиции, соответствующей позиции 58, V в позиции, соответствующей позиции 83, P в позиции, соответствующей позиции 204, M в позиции, соответствующей позиции 234, A в позиции, соответствующей позиции 261, Q в позиции, соответствующей позиции 310, и H в позиции, соответствующей позиции 421, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

10. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.1-9, включающий замену на P в позиции, соответствующей позиции 204 в полипептиде PH20, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

11. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.1-9, включающий замену на R в позиции, соответствующей позиции 58 в полипептиде PH20, со ссылкой на позиции аминокислотных остатков, приведенные в SEQ ID NO: 3.

12. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.1-11, содержащий последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NOS: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 175, 176, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 194, 240, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 426, 430, 434, 436, 443, 444, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 551, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 или 837, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 98%, 99% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NOS: 83, 88, 93, 94, 101, 144, 148, 158, 171, 175, 176, 177, 178, 180, 182, 183, 184, 185, 194, 240, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 268, 270, 272, 307, 309, 327, 334, 341, 351, 352, 353, 356, 357, 358, 359, 361, 424, 426, 430, 434, 436, 443, 444, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 454, 461, 480, 487, 489, 492, 495, 504, 505, 509, 527, 544, 551, 576, 589, 600, 603, 607, 612, 614, 647, 658, 683, 687, 733, 736, 741, 754, 763, 768, 781, 796, 797, 809, 818, 829 или 837 и содержит аминокислотную замену.

13. Модифицированный полипептид PH20 по любому из пп.1-11, включающий вплоть до десяти замен аминокислот.

14. Модифицированный полипептид по п.10, включающий замену на P в позиции, соответствующей позиции 204 в полипептиде PH20, и до 5 дополнительных аминокислотных замен, где аминокислотная замена (замены) представляет собой замену (замены) в немодифицированном полипептиде PH20,

состоящем из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NOS: 3 или 32-66.

15. Модифицированный полипептид РН20 по любому из пп.1-14, где модифицированный полипептид РН20 является гликозилированным.

16. Модифицированный полипептид РН20 по любому из пп.1-15, который модифицирован путем конъюгации с полимером.

17. Модифицированный полипептид РН20 по п.16, где полимер представляет собой декстран или PEG.

18. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированный полипептид РН20 по любому из пп.1-17.

19. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.18.

20. Клетка, включающая вектор по п.19.

21. Фармацевтическая композиция, включающая модифицированный полипептид РН20 по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, включающая эффективное против микроорганизмов количество фенольного консерванта (консервантов).

23. Фармацевтическая композиция по п.21 или 22, включающая терапевтически активный агент.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, где терапевтический агент представляет собой полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, лекарство, низкомолекулярное соединение или органическую молекулу.

25. Фармацевтическая композиция по п.23 или 24, где терапевтический агент выбран из антитела, иммуноглобулина, цитокина, химиотерапевтического агента, фактора коагуляции и инсулина.

26. Фармацевтическая композиция по любому из пп.23-25, где терапевтический агент представляет собой инсулин, который представляет собой быстродействующий инсулин.

27. Фармацевтическая композиция по любому из пп.23-25, где терапевтический агент представляет собой антитело, которое представляет собой моноклональное антитело.

28. Способ лечения ассоциированного с гиалуронатом заболевания или состояния, включающий введение субъекту модифицированного полипептида РН20 по любому из пп.1-17 или фармацевтической композиции по любому из пп.21-27.

29. Способ по п.28, где ассоциированное с гиалуронатом заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

30. Способ по п.28, где ассоциированное с гиалуронатом заболевание или состояние выбрано из сердечно-сосудистого расстройства, офтальмологического расстройства, легочного заболевания, целлюлита, внутридискового давления, отека и пролиферативного расстройства.

31. Способ лечения диабета, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.26.

32. Способ усиления доставки терапевтического агента субъекту, включающий введение субъекту модифицированного полипептида РН20 по любому из пп.1-17 или фармацевтической композиции по любому из пп.21-27 и введение терапевтического агента.

33. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.21-27 для лечения ассоциированного с гиалуронатом заболевания или состояния или для доставки терапевтического агента субъекту.

34. Применение по п.33, где ассоциированное с гиалуронатом заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

35. Применение по п.33, где ассоциированное с гиалуронатом заболевание или состояние выбрано из сердечно-сосудистого расстройства, офтальмологического расстройства, легочного заболевания, целлюлита, внутридискового давления, отека и пролиферативного расстройства.

36. Применение фармацевтической композиции по п.26 для лечения диабета.

37. Способ идентификации или отбора модифицированного полипептида РН20, который проявляет стабильность в денатурирующих условиях, где способ включает:

а) тестирование гиалуронидазной активности модифицированного полипептида РН20 в композиции, включающей денатурирующий агент, и/или в денатурирующих условиях;

б) тестирование гиалуронидазной активности модифицированного полипептида РН20 в такой же композиции и/или в тех же условиях, как на стадии а), но в отсутствие денатурирующего агента или денатурирующего условия; и

с) отбор или идентификацию модифицированного полипептида РН20, который проявляет активность на стадии а), которая составляет по меньшей мере 5% активности, проявляемой на стадии б); и/или способ включает:

а) тестирование активности модифицированного полипептида РН20 в композиции, включающей денатурирующий агент, и/или в денатурирующих условиях;

б) тестирование активности соответствующего немодифицированного полипептида РН20 в композиции, содержащей такой же денатурирующий агент, и/или в таких же денатурирующих условиях, как на стадии а), за счет чего активность тестируют в таких же условиях, как на стадии а); и

с) отбор или идентификацию модифицированного полипептида РН20, который проявляет большую

активность, составляющую по меньшей мере 120% активности по сравнению с немодифицированным деградирующим гиалуронан ферментом.

38. Способ по п.37, включающий:

д) сравнение активности на стадии а) для выбранного или идентифицированного модифицированного полипептида PH20 с активностью немодифицированного полипептида PH20, протестированного в тех же условиях; и

е) идентификацию или отбор модифицированного полипептида PH20, проявляющего по меньшей мере 120, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000% или большую гиалуронидазную активность по сравнению с немодифицированным деградирующим гиалуронан ферментом.

39. Способ по п.37 или 38, где денатурирующий агент или денатурирующие условия созданы температурой, перемешиванием, отсутствием или низким содержанием соли или присутствием эксципиента.

40. Способ по любому из пп.37-39, где денатурирующий агент или условие представляет собой денатурирующий эксципиент, выбранный из антиагрегатных агентов, связывающих, агентов для покрытия оболочкой, наполнителей и разбавителей, вкусоароматических агентов, красителей, смазывающих веществ, глицеролов, консервантов, сорбентов и подсластителей.

41. Способ по п.40, где денатурирующий агент или условие представляет собой консервант.

42. Способ по п.41, где консервант представляет собой фенольный консервант.

43. Способ по любому из пп.37-42, где модифицированный полипептид PH20 содержит аминокислотную замену, вставку или делецию аминокислот по сравнению с немодифицированным деградирующим гиалуронан ферментом.

44. Способ по любому из пп.37-43, где немодифицированный полипептид PH20 представляет собой гиалуронидазу PH20 или ее укороченную форму, у которой отсутствует С-концевой участок присоединения гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря или часть участка присоединения GPI якоря, где укороченная форма проявляет гиалуронидазную активность.

45. Способ по п.44, где немодифицированный полипептид PH20 представляет собой PH20 человека или ее укороченную с С-конца форму.

```

LNFRAPPVIVPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
LGYYPYIDSTITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
RNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEITIKLGKLLRPNHL 180
WGYLFPDCYNHNYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
LYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPPLPVFAYTRIVFTDQMLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLC@EQGVCIRKNWNSS 360
DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE@DLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
DVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVAVSL 474
    
```

Фиг. 1

```

SEQ ID NO_3 LNFRAPPVIVPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ LNFRAPPVIVPNVFLWAWNAPSEFCLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
*****

SEQ ID NO_3 LGYYPYIDSTITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ LGYYPYIDSTITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
*****

SEQ ID NO_3 RNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEITIKLGKLLRPNHL 180
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ RNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVEITIKLGKLLRPNHL 180
*****

SEQ ID NO_3 WGYLFPDCYNHNYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ WGYLFPDCYNHNYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****

SEQ ID NO_3 LYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPPLPVFAYTRIVFTDQMLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ LYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPPLPVFAYTRIVFTDQMLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****

SEQ ID NO_3 IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLC@EQGVCIRKNWNSS 360
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLC@EQGVCIRKNWNSS 360
*****

SEQ ID NO_3 DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE@DLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE@DLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
*****

SEQ ID NO_3 DVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVAVSL 474
шимпанзе_SEQ ID NO_10_ DVCIADGVCIDAFLKPPMETEESQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVAVSL 474
*****
    
```

Фиг. 2A


```

SEQ ID NO_3      LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
гиббон_SEQ ID NO_857 LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
*****

SEQ ID NO_3      LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
гиббон_SEQ ID NO_857 LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
*****

SEQ ID NO_3      RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
гиббон_SEQ ID NO_857 RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
*****

SEQ ID NO_3      WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
гиббон_SEQ ID NO_857 WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****

SEQ ID NO_3      LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
гиббон_SEQ ID NO_857 LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****

SEQ ID NO_3      IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
гиббон_SEQ ID NO_857 IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
*****

SEQ ID NO_3      DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
гиббон_SEQ ID NO_857 DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
*****

SEQ ID NO_3      DVCIADGVCIDAFKPPMETEEPQIFY----- 447
гиббон_SEQ ID NO_857 DVCIADGVCIDAFKPPKETEESQIFYNASPSTLSATMFIWLEVDQGISRMGFF 474
*****

```

Фиг. 2J

```

SEQ ID NO_3      LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
игрунка_SEQ ID NO_859 LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
*****

SEQ ID NO_3      LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
игрунка_SEQ ID NO_859 LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
*****

SEQ ID NO_3      RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
игрунка_SEQ ID NO_859 RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
*****

SEQ ID NO_3      WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
игрунка_SEQ ID NO_859 WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****

SEQ ID NO_3      LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
игрунка_SEQ ID NO_859 LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****

SEQ ID NO_3      IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
игрунка_SEQ ID NO_859 IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
*****

SEQ ID NO_3      DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
игрунка_SEQ ID NO_859 DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
*****

SEQ ID NO_3      DVCIADGVCIDAFKPPMETEEP-QIFY----- 447
игрунка_SEQ ID NO_859 DVCIADGVCIDASLPPKETEESQIFYNPSSTPSAAIFIVAILFFISCVVSL 474
*****

```

Фиг. 2K

```

SEQ ID NO_3      LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
орангутан_SEQ ID NO_861 LNFRAAPPVIPNVFPLWAWNAPSEFCGLGKDFEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDR 60
*****

SEQ ID NO_3      LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
орангутан_SEQ ID NO_861 LGYYYPYIDSIITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGMAVIDWEWRPTWA 120
*****

SEQ ID NO_3      RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
орангутан_SEQ ID NO_861 RNWPKPDVYKNRSEIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHL 180
*****

SEQ ID NO_3      WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
орангутан_SEQ ID NO_861 WGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT 240
*****

SEQ ID NO_3      LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
орангутан_SEQ ID NO_861 LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG 300
*****

SEQ ID NO_3      IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
орангутан_SEQ ID NO_861 IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPIYINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKKNWNS 360
*****

SEQ ID NO_3      DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
орангутан_SEQ ID NO_861 DYHLHLPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAV 420
*****

SEQ ID NO_3      DVCIADGVCIDAFKPPMETEEPQIFY----- 447
орангутан_SEQ ID NO_861 DVCIADGVCIDAFKPPMETEESQIFYNASPSTLSATMFIWRLEVDQGISRMGFF 476
*****

```

Фиг. 2L



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2