



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I489994 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：098108166

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

A61K38/47 (2006.01)

C07K16/06 (2006.01)

(30)優先權：2008/03/17 美國

61/069,841

(71)申請人：巴克斯特保健公司(瑞士)BAXTER HEALTHCARE S.A. (CH)

瑞士

巴克斯特國際公司(美國)BAXTER INTERNATIONAL INC. (US)

美國

哈羅賽公司(美國)HALOZYME, INC. (US)

美國

(72)發明人：史夫 理查 SCHIFF, RICHARD (US)；雷柏 赫恩斯 LEIBL, HEINZ (AT)；芙羅

斯 葛傑瑞 I FROST, GREGORY I. (US)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

(56)參考文獻：

2008年02月，“Recombinant Human Hyaluronidase Facilitates Dispersion of Subcutaneously Administered Gammagard Liquid and Enables Administration of a Full Monthly Dose in a Single Site to Patients with Immunodeficiency Diseases.” Melamed et al., The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 121, Issue 2, Supplement 1, Page S83

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：60 項 圖式數：0 共 198 頁

(54)名稱

供免疫球蛋白及玻尿酸酶之皮下投藥之用的組合及方法

COMBINATIONS AND METHODS FOR SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE GLOBULIN AND HYALURONIDASE

(57)摘要

本發明提供經調配以用於皮下投藥之含有免疫球蛋白(IG)組合物及可溶性玻尿酸酶組合物之組合、組合物及套組。該等產品可用於治療 IG 可治療性疾疾病或病狀之方法中。本發明亦提供用於皮下投予免疫球蛋白之方法，藉此給藥攝生法實質上與靜脈內投予相同劑量以治療相同 IG 可治療性疾疾病或病狀之給藥攝生法相同。

Provided are combinations, compositions and kits containing a immune globulin (IG) composition and a soluble hyaluronidase composition formulated for subcutaneous administration. Such products can be used in methods of treating IG-treatable diseases or conditions. Also provided are methods for subcutaneous administration of immune globulin whereby the dosing regimen is substantially the same as for intravenous administration of the same dosage for treatment of the same IG-treatable disease or condition.

| |
|-------|
| 公 告 本 |
|-------|

發明專利說明書

98 7.24
修正

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98108166

A61K 39/395 (2006.01)

※申請日：98.3.13

※IPC 分類：A61K 38/47 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C07K 16/06 (2006.01)

供免疫球蛋白及玻尿酸酶之皮下投藥之用的組合及方法

COMBINATIONS AND METHODS FOR
SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF IMMUNE
GLOBULIN AND HYALURONIDASE

二、中文發明摘要：

本發明提供經調配以用於皮下投藥之含有免疫球蛋白 (IG) 組合物及可溶性玻尿酸酶組合物之組合、組合物及套組。該等產品可用於治療 IG 可治療性疾病或病狀之方法中。本發明亦提供用於皮下投予免疫球蛋白之方法，藉此給藥攝生法實質上與靜脈內投予相同劑量以治療相同 IG 可治療性疾病或病狀之給藥攝生法相同。

三、英文發明摘要：

Provided are combinations, compositions and kits containing a immune globulin (IG) composition and a soluble hyaluronidase composition formulated for subcutaneous administration. Such products can be used

in methods of treating IG-treatable diseases or conditions.

Also provided are methods for subcutaneous administration of immune globulin whereby the dosing regimen is substantially the same as for intravenous administration of the same dosage for treatment of the same IG-treatable disease or condition.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

98年9月10日
修正頁
補充
六、發明說明。

相關申請案

主張對 Richard Schiff、Heinz Leibl 及 Gregory Frost 於 2008 年 3 月 17 日申請之名為「Combinations and Methods for Subcutaneous Administration of Immune Globulin and Hyaluronidase」之美國臨時申請案第 61/069,841 號的優先權。在允許之情況下，上文所述之申請案之主題物係以引用之方式全文併入。

【發明所屬之技術領域】

本發明提供經調配以供皮下投藥之含有免疫球蛋白（IG）組合物及可溶性玻尿酸酶組合物之組合、組合物及套組。該等產品可用於治療 IG 可治療性疾病或病狀之方法中。本發明亦提供用於皮下投予免疫球蛋白之方法，藉此給藥攝生法實質上與靜脈內投予相同劑量以治療相同 IG 可治療性疾病或病狀之給藥攝生法相同。

【先前技術】

靜脈內（IV）投予免疫球蛋白（IVIG）為對具有免疫缺乏症之個體的一線治療（primary treatment）。儘管初始 IVIG 製劑會引起嚴重副作用，但目前可用之 IVIG 製劑可為大多數免疫缺乏症患者良好耐受。儘管如此，小比例患者仍持續具有令人不快、甚至失能之反應，諸如頭痛、疲勞及肌痛。尤其當患者具有間發性感染時，存在發燒及寒冷

問題。儘管嘗試其他 IVIG 製劑或用乙醯胺苯酚 (acetaminophen)、苯海拉明 (diphenhydramine) 及皮質類固醇 (corticosteroid) 預先給藥，但該等反應常常持續存在。此外，由於 IV 投藥之需要，所以存在患者順應性之問題。

免疫球蛋白之皮下 (SQ) 投藥可替代靜脈內投藥。與 IV 輸注相比，SQ 投予免疫球蛋白具有若干優勢。舉例而言，其減少全身性反應之發生率，不需要往往困難之 IV 進入，改良最低含量且給予患者更多獨立性。由於難以在單個部位中投予大量流體，所以需要每次使用兩個至多達 5 個部位來一週進行 SQ 輸注一次或兩次。因此，不同於一月一次給予之 IVIG，皮下投藥通常每週進行一次。因此，存在對投予免疫球蛋白之替代方法的需求。

【發明內容】

本文中提供用於皮下投予免疫球蛋白且用於治療 IG 可治療性疾病或病狀之方法、組合物、組合及套組。提供用於治療個體之 IG 可治療性疾病或病狀之方法，該方法係藉由向該個體皮下投予可溶性玻尿酸酶及免疫球蛋白 (IG) 以治療該疾病或病狀。共同投予 IG 及玻尿酸酶會增加經皮下投予之 IG 之生物可用率，從而允許針對特定疾病或病狀使用實質上與靜脈內 IG (IVIG) 投藥相同之給藥攝生法皮下投予 IG。IG 之投藥經達成以使所投予之量及投藥頻率實質上與經由 IV 以相同量用於相同疾病或病狀之 IV (靜脈內) 投藥相同。經由 IV 所投予之量對於特定疾病或病狀而言可

經預定或為已知的。在可溶性玻尿酸酶存在下，對於皮下投藥而言，投藥速率可典型地大於 IV 投藥之速率。因此，可減少投予特定劑量之時間。投藥速率可諸如藉由泵來控制或可依靠重力。

因此，在該等方法中，提供用於治療需要該治療之個體之 IG 可治療性疾病或病狀的方法，該等方法係藉由向該個體皮下投予可溶性玻尿酸酶及有效治療該疾病或病狀之量的免疫球蛋白 (IG) 來實施。以如下劑量攝生法進行該投予，其中：(a) IG 之量及 (b) 用於向該個體連續投予 IG 之給藥頻率經選擇以使皮下 IG 投藥對患者之治療作用至少實質上等於使用相同給藥攝生法向個體靜脈內投予 IG 之治療作用。

在本文中所提供之方法的一些實例中，皮下投予 IG 之生物可用率至少約為經由 IV 投藥所投予之相同劑量之生物可用率的 90%。所投予之可溶性玻尿酸酶之量可足以達成以所投予之劑量不超過一月一次皮下投予 IG。在其他實例中，IG 之投藥不超過每月一次。

本文中所提供之方法及用途中所用之可溶性玻尿酸酶為 PH20 或其截短形式。舉例而言，可溶性玻尿酸酶可為綿羊或牛或截短型人類 PH20。在截短型人類 PH20 用於本文中所提供之方法及用途中之情況下，該截短型人類 PH20 可選自具有 SEQ ID NO:4-9 中之任一者所闡明之胺基酸序列的多肽或其對偶基因變異體或其他變異體。在一實例中，該可溶性玻尿酸酶為 rHuPH20。

使用本文中之方法及用途所投予之 IG 可諸如藉由醇分餾 (alcohol fractionation) 而自人類血漿純化。在一些實例中，藉由以下各者中之任一或多者來進一步純化 IG：化學修飾、在胃蛋白酶存在或不存在之情況下在 4.0 之 pH 下培育、聚乙二醇 (PEG) 沈澱、離子交換層析、酶促裂解、溶劑清潔劑處理、透濾或超濾。本文中所提供之方法及用途可使用含有 IgG、IgA 及 IgM 之 IG。在一些實例中，IG 含有大於 95% 之 IgG。

此外，IgG 可為單體。諸如甘胺酸、麥芽糖、多元醇 (polyol)、人血清白蛋白、甘露醇、及非離子型清潔劑中之一或多者之蛋白質穩定賦形劑亦可存在於 IG 中。在一些實例中，IG 製劑之 pH 為或約為 4.2 至 5.4、4.6 至 5.1 或 4.8 至 5.0，且蛋白質濃度為或約為 IG 組合物之 5% 至 15% w/v、6% 至 15% w/v、或 8% 至 12% w/v。在一實例中，IG 之蛋白質濃度為 10% w/v。

本文中提供治療 IG 可治療性疾病或病狀之方法及用途，其中皮下投予用於治療疾病或病狀之可溶性玻尿酸酶及免疫球蛋白 (IG)，且 IG 係以 10 ml/hr 至 300 ml/hr 之速率輸注，諸如等於或約 10 ml/hr、20 ml/hr、30 ml/hr、40 ml/hr、50 ml/hr、60 ml/hr、70 ml/hr、80 ml/hr、90 ml/hr、100 ml/hr、150 ml/hr、200 ml/hr、250 ml/hr 及 300 ml/hr。可藉由泵或重力來控制速率。在一些實例中，分開、同時或間歇投予 IG 及玻尿酸酶。舉例而言，可在投予 IG 前投予玻尿酸酶，諸如在投予 IG 前 0.5 分鐘、1 分鐘、2 分鐘、

3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、6 分鐘、7 分鐘、8 分鐘、9 分鐘、10 分鐘、20 分鐘或 30 分鐘。在其他實例中，IG 及玻尿酸酶係處於單一組合物中。在其他實例中，投予約或等於 5 公克 (g)、10 g、15g、20 g、21 g、22 g、23 g、24 g、25 g、26 g、27 g、28 g、29 g、30 g、31 g、32 g、33 g、34 g、35 g、36 g、37 g、38 g、39 g 或 40 g IG，且以等於或約為 10 U /公克 (g)、20 U/g、30 U/g、35 U/g、40 U/g、50 U/g、60 U/g、70 U/g、80 U/g、90 U/g、100 U/g、150 U/g、或 300 U/g 之比率（玻尿酸酶單位數/IG 公克數）來投予玻尿酸酶。

可使用本文中所提供之方法及用途來投予可溶性玻尿酸酶及 IG 以治療例如免疫缺乏症；血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症；川崎氏病 (Kawasaki's disease)；慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病 (CIDP)；格巴二氏症候群 (Guillain-Barre Syndrome)；特發性血小板減少性紫癍；發炎性肌病；蘭伯特-伊頓肌無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome)；多灶性運動神經病；重症肌無力；莫氏-沃特曼症候群 (Moersch-Woltmann syndrome)；繼發性低 γ 球蛋白血症 (包括醫原性免疫缺乏症)；特異性抗體缺乏；急性播散性腦脊髓炎；ANCA 陽性全身壞死性脈管炎；自體免疫溶血性貧血；大水皰性天疱瘡樣病；癍痕性天疱瘡樣病；伊文氏症候群 (Evans syndrome) (包括具有免疫性血小板減少症之自體免疫溶血性貧血)；母胎/新生兒同種免疫性血小板減少症 (Foeto-maternal/neonatal

alloimmune thrombocytopenia, FMAIT/NAIT); 噬血細胞症候群 (Haemophagocytic syndrome); 高風險同種異體造血幹細胞移植; IgM 副蛋白血症神經病 (IgM paraproteinaemic neuropathy); 腎移植; 多發性硬化; 眼陣攣肌陣攣運動失調; 落葉型天疱瘡; 尋常天疱瘡; 輸血後紫癍; 中毒性表皮壞死溶解 / 史蒂芬強生症候群 (Toxic epidermal necrolysis/Steven Johnson syndrome, TEN/SJS); 中毒性休克症候群; 阿耳滋海默氏病 (Alzheimer's Disease); 全身性紅斑狼瘡; 多發性骨髓瘤; 膿毒病; B 細胞瘤; 創傷; 及細菌、病毒或真菌感染。在投予 IG 及玻尿酸酶以治療免疫缺乏症之情況下, 該免疫缺乏症可選自常見變異性免疫缺乏症 (CVID)、先天無 γ 球蛋白血症、維斯科特-奧爾德里奇症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome)、嚴重複合型免疫缺乏症 (SCID)、原發性低 γ 球蛋白血症、具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏疾病、X-連結無 γ 球蛋白血症 (XLA)、嬰兒期低 γ 球蛋白血症、及無抗體之副腫瘤性小腦變性。

在 IG 可治療性疾病或病狀為血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症之情況下, 該血液惡性腫瘤可為慢性淋巴細胞性白血病 (CLL)、多發性骨髓瘤 (MM) 或非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL)。在 IG 可治療性疾病或病狀為發炎性肌病之情況下, 該發炎性肌病可為多發性肌炎、皮膚炎或包涵體肌炎。

在一些實例中, 皮下投予可溶性玻尿酸酶及 IG 以治療細菌、病毒或真菌病狀, 諸如 B 型流感嗜血桿菌

(*Haemophilus influenzae*)、A 型及 B 型綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、B 群鏈球菌 (*Streptococcus*)、1 型、3 型、4 型、6 型、7 型、8 型、9 型、12 型、14 型、18 型、19 型及 23 型肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、2 型及 5 型腺病毒、細胞巨大病毒、E-B 病毒 VCA (Epstein Barr virus VCA)、A 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒、疱疹單純型病毒-1、疱疹單純型病毒-2、A 型流行性感冒、麻疹、1 型、2 型及 3 型副流行性感冒、脊髓灰質炎、水痘帶狀疱疹病毒 (*Varicella zoster virus*)、麴菌 (*Apergillus*) 及白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

本文中提供含有第一組合物及第二組合物之組合物組合，該第一組合物含有經調配以用於不超過每月一次皮下單一劑量投藥之 IG，且該第二組合物含有經調配以用於不超過每月一次單一劑量投藥之可溶性玻尿酸酶。組合物可處於雙腔室容器中或處於彼此分離之單個容器中。在一些實例中，玻尿酸酶係位於供在 IG 之前投藥的容器中。該容器可為注射器、管或瓶，且可進一步含有注射用針。

本文中所提供之組合物組合可含有 PH20 或其截短形式。舉例而言，本文中所提供之組合物組合中可包括綿羊、牛或截短型人類 PH20，諸如具有 SEQ ID NO:4-9 中之任一者中所闡明之胺基酸序列的多肽或其對偶基因變異體或其他變異體。在一些實例中，組合中之可溶性玻尿酸酶為 rHuPH20。此外，組合物組合中之 IG 可自人類血漿純化，

且可經冷凍乾燥或為液體。

在一些實例中，本文中所提供之組合物組合中之液體體積為或約為 100 ml、150 ml、200 ml、300 ml、400 ml、500 ml、600 ml 或 700 ml。組合物組合中之 IG 可具有為或約為 IG 組合物之 5% 至 15% w/v、6% 至 15% w/v、或 8% 至 12% w/v 之蛋白質濃度，諸如 10% w/v。在一些實例中，組合物中之 IG 為或約為 5 公克 (g)、10 g、15 g、20 g、21 g、22 g、23 g、24 g、25 g、26 g、27 g、28 g、29 g、30 g、31 g、32 g、33 g、34 g、35 g、36 g、37 g、38 g、39 g 或 40 g。玻尿酸酶可為液體。在一些實例中，玻尿酸酶液體體積為或約為 1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml、7 ml、8 ml、9 ml、10 ml、20 ml 或 30 ml，且玻尿酸酶為或約為 10 單位至 500,000 單位、100 單位至 100,000 單位、500 單位至 50,000 單位、1000 單位至 10,000 單位、5000 單位至 7500 單位、5000 單位至 50,000 單位、或 1,000 單位至 10,000 單位。

本文中提供經調配以用於一月一次單一劑量投藥之含有免疫球蛋白 (IG) 及可溶性玻尿酸酶之組合物。組合物中所含有之可溶性玻尿酸酶可為 PH20 或其截短形式。舉例而言，本文中所提供之經調配以用於單一劑量投藥之組合物中可包括綿羊、牛或截短型人類 PH20，諸如具有 SEQ ID NO:4-9 中之任一者中所闡明之胺基酸序列的多肽或其對偶基因變異體或其他變異體。在一些實例中，組合物中之可溶性玻尿酸酶為 rHuPH20。組合物中之 IG 可自人類血漿純

化，且可為液體。

在例示性具體實例中，本文中所提供之經調配以用於單一劑量投藥之組合物中的 IG 具有為或約為 IG 組合物之 5% 至 15% w/v、6% 至 15% w/v、或 8% 至 12% w/v 之蛋白質濃度，諸如 10% w/v。組合物中之 IG 為或約為 5 公克 (g)、10 g、15 g、20 g、21 g、22 g、23 g、24 g、25 g、26 g、27 g、28 g、29 g、30 g、31 g、32 g、33 g、34 g、35 g、36 g、37 g、38 g、39 g 或 40 g，且玻尿酸酶為或約為 10 單位至 500,000 單位、100 單位至 100,000 單位、500 單位至 50,000 單位、1000 單位至 10,000 單位、5000 單位至 7500 單位、5000 單位至 50,000 單位、或 1,000 單位至 10,000 單位。組合物中之液體體積可為或約為 100 ml、150 ml、200 ml、300 ml、400 ml、500 ml、600 ml 或 700 ml。

本文中提供含有組合物組合之套組，該等組合物組合包含含有經調配以用於不超過每月一次皮下單一劑量投藥之 IG 的第一組合物，及含有經調配以用於不超過每月一次單一劑量投藥之可溶性玻尿酸酶的第二組合物。本文中亦提供含有免疫球蛋白 (IG) 及可溶性玻尿酸酶之組合物，其經調配以用於一月一次單一劑量投藥。視情況，在套組中可包括說明書。

【實施方式】

提綱

A. 定義

B. 免疫球蛋白 (IG) 之皮下投藥

C. 免疫球蛋白

D. 玻尿酸酶

可溶性玻尿酸酶

可溶性人類 PH20

可溶性重組人類 PH20 (rHuPH20)

E. 產生編碼可溶性玻尿酸酶及其多肽之核酸之方法

1. 載體及細胞

2. 表現

a. 原核細胞

b. 酵母細胞

c. 昆蟲細胞

d. 哺乳動物細胞

e. 植物

3. 純化技術

F. 免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶多肽之製備、調配

及投藥

1. 調配物

冷凍乾燥粉末

2. 劑量及投藥

G. 評定活性、生物可用率及藥物動力學之方法

1. 藥物動力學及可耐受性

2. 生物活性

a. 免疫球蛋白

b. 玻尿酸酶

H. 治療用途

1. 具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏症
2. 血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症
3. 川崎氏病
4. 慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病
5. 格巴二氏症候群
6. 特發性血小板減少性紫癍
7. 發炎性肌病：多發性肌炎、皮肌炎及包涵體肌炎
8. 蘭伯特-伊頓肌無力症候群
9. 多灶性運動神經病
10. 重症肌無力
11. 莫氏-沃特曼症候群
12. 其他疾病及病狀

I. 製品及套組

J. 實施例

A. 定義

除非另外定義，否則本文中所有技術及科學術語具有與熟習本發明所屬技術者通常所瞭解之意義相同之意義。除非另外說明，否則在本文中遍及整個揭示案所參考之所有專利、專利申請案、公開申請案及公開案、Genbank 序列、資料庫、網站及其他公開材料係以引用之方式全文併入。在對於本文中之術語存在複數個定義之情況下，以

本節中之彼等定義為準。在參考 URL 或其他該種識別符或位址之情況下，應瞭解該等標識符可變化且網際網路上之特定資訊可來回變化，但可藉由搜尋網際網路發現等效資訊。對資訊之參考證明該資訊之可用性及公眾傳播。

如本文中所用，「免疫球蛋白」、「 γ 球蛋白」係指源自成人捐獻者之彙集血漿的血漿蛋白製劑。IgG 抗體占大多數；存在其他抗體亞類，諸如 IgA 及 IgM。治療性免疫球蛋白可藉由增加接受者之循環抗體之血清含量來提供被動免疫。IgG 抗體可例如與細菌毒素結合且中和細菌毒素；使病原體受調理 (opsonize)；活化補體；且經由與細胞因子及其受體 (諸如 CD5、介白素-1a (IL-1a)、介白素-6 (IL-6)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 及 T 細胞受體) 相互作用來抑制病原性細胞因子及吞噬細胞。治療性免疫球蛋白可抑制自體抗體之活性。免疫球蛋白製劑亦包括 (但不限於) 免疫球蛋白靜脈內注射劑 (immune globulin intravenous, IGIV)、免疫球蛋白 IV、治療性免疫球蛋白。免疫球蛋白製劑為熟知的且包括諸如 BayGam[®]、Gamimune[®] N、Gammagard[®] S/D、Gammar[®]-P、Iveegam[®] EN、Panglobulin[®]、Polygam[®] S/D、Sandoglobulin[®]、Venoglobulin[®]-I、Venoglobulin[®]-S、WinRho[®] SDF 等商標名。

如本文中所用，IG 可治療性疾病或病狀係指針對其使用免疫球蛋白製劑之任何疾病或病狀。該等疾病及病狀包括 (但不限於) 其中循環抗體增加具有改善性之任何疾病，諸如免疫缺乏症；血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血

症；川崎氏病；慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病（CIDP）；格巴二氏症候群；特發性血小板減少性紫癍；發炎性肌病；蘭伯特-伊頓肌無力症候群；多灶性運動神經病；重症肌無力；莫氏-沃特曼症候群；繼發性低 γ 球蛋白血症（包括醫源性免疫缺乏症）；特異性抗體缺乏；急性播散性腦脊髓炎；ANCA陽性全身壞死性脈管炎；自體免疫溶血性貧血；大水皰性天庖瘡樣病；癍痕性天庖瘡樣病；伊文氏症候群（包括具有免疫性血小板減少症之自體免疫溶血性貧血）；母胎/新生兒同種免疫性血小板減少症；噬血細胞症候群；高風險同種異體造血幹細胞移植；IgM副蛋白血症神經病；腎移植；多發性硬化；眼陣攣肌陣攣運動失調（Opsoclonus myoclonus ataxia）；落葉型天庖瘡（Pemphigus foliaceus）；尋常天庖瘡；輸血後紫癍；中毒性表皮壞死溶解/史蒂芬強生症候群（TEN/SJS）；中毒性休克症候群；阿耳滋海默氏病；全身性紅斑狼瘡；多發性骨髓瘤；膿毒病；B細胞腫瘤；創傷；及細菌、病毒或真菌感染。

如本文中所用，給藥攝生法係指所投予之免疫球蛋白量及投藥頻率。給藥攝生法隨待治療之疾病或病狀而變，且因此可不同。

如本文中所用，「實質上與靜脈內IG（IVIG）給藥攝生法相同」係指其中劑量及/或頻率處於有效治療特定疾病或病狀之量的範圍內且典型地約為或等於IV劑量或頻率之10%的攝生法。有效治療特定疾病或病狀之IVIG之量為已知的或可由熟習此項技術者憑經驗判定。舉例而言，如下

文所例示，300 mg/kg（亦即，假定平均成人體重為 70 kg 則投予 21 公克）至 600 mg/kg（亦即 42 公克）為向具有原發性免疫缺乏疾病之患者每月投予之 IVIG 的典型劑量。因此，當與玻尿酸酶組合投予 IG 時，以等於或約為 300 mg/kg 至 600 mg/kg 之劑量皮下投予 IG 來治療原發性免疫缺乏疾病。

如本文中所用，投藥頻率係指免疫球蛋白之逐次給藥之間的時間。舉例而言，頻率可為一週、兩週、三週、四週且隨所治療之特定疾病或病狀而變。一般而言，頻率為至少每隔兩週或三週一次，且典型地不超過一月一次。

如本文中所用，玻尿酸酶係指降解玻尿酸之酶。玻尿酸酶包括細菌玻尿酸酶（EC 4.2.99.1）、來自水蛭、其他寄生蟲及甲殼類動物之玻尿酸酶（EC 3.2.1.36）及哺乳動物型玻尿酸酶（EC 3.2.1.35）。玻尿酸酶亦包括非人源性（包括（但不限於）鼠、犬、貓、野兔、鳥、牛、綿羊、豬、馬、魚、蛙科動物、細菌）玻尿酸酶中之任一者以及來自水蛭、其他寄生蟲及甲殼類動物之任何玻尿酸酶。例示性非人類玻尿酸酶包括：來自母牛（SEQ ID NO:10 及 11）、小黃蜂（yellow jacket wasp）（SEQ ID NO:12 及 13）、蜜蜂（SEQ ID NO:14）、白臉大黃蜂（SEQ ID NO:15）、胡蜂（paper wasp）（SEQ ID NO:16）、小鼠（SEQ ID NO:17-19、31）、豬（SEQ ID NO:20-21）、大鼠（SEQ ID NO:22-24、30）、家兔（SEQ ID NO:25）、羊（SEQ ID NO:26 及 27）、猩猩（SEQ ID NO:28）、獼猴（cynomolgus monkey）（SEQ ID NO:29）、豚

鼠 (SEQ ID NO:32)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (SEQ ID NO:33)、釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (SEQ ID NO:34) 及產氣英膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) (SEQ ID NO:35) 之玻尿酸酶。玻尿酸酶亦包括彼等人源性玻尿酸酶。例示性人類玻尿酸酶包括 HYAL1 (SEQ ID NO:36)、HYAL2 (SEQ ID NO:37)、HYAL3 (SEQ ID NO:38)、HYAL4 (SEQ ID NO:39) 及 PH20 (SEQ ID NO:1)。在玻尿酸酶中亦包括可溶性玻尿酸酶，包括綿羊及牛 PH20、可溶性人類 PH20 及可溶性 rHuPH20。

對玻尿酸酶之提及包括前驅玻尿酸酶多肽及成熟玻尿酸酶多肽 (諸如其中已移除信號序列之彼等玻尿酸酶多肽)、其具有活性之截短形式，且包括對偶基因變異體及物種變異體 (species variant)、由剪接變異體編碼之變異體及其他變異體，包括與 SEQ ID NO:1 及 10-39 中所闡明之前驅多肽具有至少 40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上之序列一致性的多肽或其成熟形式。舉例而言，對玻尿酸酶之提及亦包括 SEQ ID NO:50-51 中所闡明之人類 PH20 前驅多肽變異體。玻尿酸酶亦包括彼等含有化學或轉譯後修飾之玻尿酸酶及彼等不含化學或轉譯後修飾之玻尿酸酶。該等修飾包括 (但不限於) 聚乙二醇化、白蛋白化 (albumination)、糖基化、法尼基化 (farnesylation)、羧化、羥化、磷酸化及此項技術中已知之其他多肽修飾。

如本文中所用，可溶性玻尿酸酶係指特徵在於其在生

理條件下之溶解性之多肽。舉例而言，可溶性玻尿酸酶可藉由將其分溶於升溫至 37°C 之 Triton X-114 溶液之水相中來區別 (Bordier 等人, (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7)。膜錨定 (諸如脂錨定) 玻尿酸酶將分溶於富含清潔劑之相中，但在用磷脂酶-C 處理後將分溶於含清潔劑較少之相或水相中。在可溶性玻尿酸酶中包括膜錨定玻尿酸酶，其中在可溶形式保持玻尿酸酶活性之情況下，已移除或修飾一或多個與玻尿酸酶對膜之錨定相關之區域。可溶性玻尿酸酶包括重組可溶性玻尿酸酶及彼等在天然來源 (諸如來自羊或母牛之睪丸提取物) 中所含有或自天然來源純化之玻尿酸酶。該種可溶性玻尿酸酶之例示物為可溶性人類 PH20。其他可溶性玻尿酸酶包括綿羊 (SEQ ID NO:27) 及牛 (SEQ ID NO:11) PH20。

如本文中所用，可溶性人類 PH20 或 sHuPH20 包括成熟多肽，其缺乏所有或一部分處於 C 末端之糖基磷脂醯肌醇 (GPI) 附著位點使得該等多肽在表現後為可溶性的。例示性 sHuPH20 多肽包括成熟多肽，其具有 SEQ ID NO:4-9 及 47-48 中之任一者中所闡明之胺基酸序列。該等例示性 sHuPH20 多肽之前驅多肽包括信號序列。該等前驅體之例示物為 SEQ ID NO:3 及 40-46 中所闡明之彼等前驅體，其各自含有處於 1-35 位胺基酸位置上之 35 個胺基酸信號序列。可溶性 HuPH20 多肽亦包括在本文中所述之製備及純化方法期間或之後降解之彼等 HuPH20 多肽。

如本文中所用，可溶性重組人類 PH20 (rHuPH20) 係

指以重組方式表現於中國倉鼠卵巢（CHO）細胞中之人類 PH20 之可溶解形式。可溶性 rHuPH20 係藉由包括信號序列之核酸來編碼且在 SEQ ID NO:49 中闡明。亦包括為其對偶基因變異體及其他可溶性變異體之 DNA 分子。編碼可溶性 rHuPH20 之核酸係表現於分泌成熟多肽之 CHO 細胞中。如在培養基中所產生，在 C 末端處存在異質性使得產物包括可以各種含量包括 SEQ ID NO:4-9 中任一或多者之物質混合物。亦包括相對應對偶基因變異體及其他變異體，包括彼等與 SEQ ID NO:50-51 中所闡明之前驅人類 PH20 多肽相應之變異體。只要其他變異體保持玻尿酸酶活性且為可溶性的，則該等變異體可與 SEQ ID NO:4-9 及 47-48 中任一者具有 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上之序列一致性。

如本文中所用，活性係指與全長（完全）蛋白質相關之多肽或其部分之功能活性。功能活性包括（但不限於）生物活性、催化或酶促活性、抗原性（結合抗多肽抗體或與多肽競爭結合抗多肽抗體之能力）、免疫原性、形成多聚體之能力及與多肽之受體或配體特異性結合之能力。

如本文中所用，玻尿酸酶活性係指玻尿酸酶裂解玻尿酸之能力。測定玻尿酸酶（諸如可溶性 rHuPH20）之玻尿酸酶活性之試管內檢定在此項技術中為已知的且描述於本文中。例示性檢定包括下文所述之微濁度（microturbidity）檢定（例如參見實例 3），其藉由偵測當未裂解之玻尿酸與血清白蛋白結合時所形成之不溶性沈澱物來間接量測玻尿

酸酶對玻尿酸之裂解。

如本文中所用，天然存在之 α 胺基酸之殘基為在自然界中發現之 20 種 α 胺基酸之殘基，其係藉由人類中之負載 tRNA 分子之同源 mRNA 密碼子對負載 tRNA 分子之特異性識別而併入蛋白質中。

如本文中所用，核酸包括 DNA、RNA 及其類似物（包括肽核酸（PNA））及其混合物。核酸可為單股或雙股的。當提及視情況經諸如可偵測標記物（諸如螢光或放射性標記物）標記之探針或引子時，涵蓋單股分子。該等分子典型地具有使其標靶對於探測或啟動（priming）文庫而言為統計上唯一的或具有低複本數（典型地小於 5，一般小於 3）之長度。探針或引子一般含有與所關注之基因互補或相同之序列的至少 14 個、16 個或 30 個連續核苷酸。探針及引子可為 10 個、20 個、30 個、50 個、100 個或 100 個以上核酸長。

如本文中所用，肽係指長度為 2 個胺基酸至 40 個胺基酸之多肽。

如本文中所用，本文中所提供之各種胺基酸序列中存在之胺基酸係根據其已知之三個字母或一個字母縮寫（表 1）來標示。各種核酸片段中存在之核苷酸係以此項技術中常規使用之標準單字母名稱來表示。

如本文中所用，「胺基酸」為含有胺基及羧酸基團之有機化合物。多肽含有兩個或兩個以上之胺基酸。出於本文中之目的，胺基酸包括 20 種天然存在之胺基酸、非天然胺

基酸及胺基酸類似物(亦即,其中 α 碳具有側鏈之胺基酸)。

如本文中所用,「胺基酸殘基」係指在使多肽在其肽鏈處化學消化(水解)後所形成之胺基酸。本文中所述之胺基酸殘基假定為呈「L」異構形式。所指定之呈「D」異構形式之殘基可替代任何L-胺基酸殘基,只要多肽仍保持所需功能特性。 NH_2 係指多肽之胺基末端處存在之自由胺基。 COOH 係指多肽之羧基末端處存在之自由羧基。符合 *J. Biol. Chem.*, 243: 3557-3559 (1968) 中所述且 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822 所採用之標準多肽命名,表 1 中展示胺基酸殘基之縮寫:

表 1-對應表

| 符號 | | |
|------|------|-------------|
| 1 字母 | 3 字母 | 胺基酸 |
| Y | Tyr | 酪胺酸 |
| G | Gly | 甘胺酸 |
| F | Phe | 苯丙胺酸 |
| M | Met | 甲硫胺酸 |
| A | Ala | 丙胺酸 |
| S | Ser | 絲胺酸 |
| I | Ile | 異白胺酸 |
| L | Leu | 白胺酸 |
| T | Thr | 蘇胺酸 |
| V | Val | 纈胺酸 |
| P | Pro | 脯胺酸 |
| K | Lys | 離胺酸 |
| H | His | 組胺酸 |
| Q | Gln | 麩醯胺酸 |
| E | Glu | 麩胺酸 |
| Z | Glx | 麩胺酸及/或麩醯胺酸 |
| W | Trp | 色胺酸 |
| R | Arg | 精胺酸 |
| D | Asp | 天冬胺酸 |
| N | Asn | 天冬醯胺 |
| B | Asx | 天冬醯胺及/或天冬胺酸 |
| C | Cys | 半胱胺酸 |
| X | Xaa | 未知或其他 |

應注意，本文中藉由各式所表示之所有胺基酸殘基序列在胺基末端至羧基末端之習知方向上具有自左至右之定向。另外，短語「胺基酸殘基」經廣泛定義以包括對應表（表 1）中所列之胺基酸及經修飾及不常見之胺基酸（諸如 37 C.F.R. §§1.821-1.822 中所提及且以引用之方式併入本文中之彼等胺基酸）。此外，應注意，在胺基酸殘基序列之開端或末端處之短劃線指示與具有一或多個胺基酸殘基之另一序列、與胺基端基（諸如 NH_2 ）或與羧基端基（諸如 COOH ）鍵結之肽鍵。

如本文中所用，「天然存在之胺基酸」係指多肽中存在之 20 種 L-胺基酸。

如本文中所用，「非天然胺基酸」係指具有類似於天然胺基酸之結構但已在結構上經修飾以模擬天然胺基酸之結構及反應性的有機化合物。非天然存在之胺基酸因此包括例如除 20 種天然存在之胺基酸以外之胺基酸或胺基酸類似物且包括（但不限於）胺基酸之 D-立體異構體。例示性非天然胺基酸描述於本文中且為熟習此項技術者所知。

如本文中所用，DNA 構築體為單股或雙股、線狀或環狀 DNA 分子，其含有以在自然界中未發現之方式組合及並列之 DNA 片段。DNA 構築體係作為人類操作之產物存在且包括所操作分子之純系及其他複本。

如本文中所用，DNA 鏈段為具有特定屬性之較大 DNA 分子之一部分。舉例而言，編碼特定多肽之 DNA 鏈段為較

長 DNA 分子之一部分，諸如質體或質體片段，當自 5' 至 3' 方向讀取時，其編碼特定多肽之胺基酸序列。

如本文中所用，術語多核苷酸意謂自 5' 末端至 3' 末端讀取之去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸鹼基之單股或雙股聚合物。多核苷酸包括 RNA 及 DNA 且可自天然來源分離、試管內合成或自天然與合成分子之組合製備。多核苷酸分子之長度在本文中係以核苷酸（縮寫為「nt」）或鹼基對（縮寫為「bp」）形式給出。在上下文允許之情況下術語核苷酸係用於單股及雙股分子。當該術語用於雙股分子時，其用於表示總長且應瞭解其等同於術語鹼基對。熟習此項技術者應認識到，雙股多核苷酸之兩條鏈可在長度上略微不同且其末端可交錯排列；因此雙股多核苷酸分子中之所有核苷酸可不成對。該等不成對末端之長度一般應不超過 20 個核苷酸。

如本文中所用，兩個蛋白質或核酸之間的「相似性」係指蛋白質之胺基酸序列或核酸之核苷酸序列之間的關聯性。相似性可基於殘基與其中所含有之殘基之序列一致度及/或同源度。評定蛋白質或核酸之間的相似度之方法為熟習此項技術者所知。舉例而言，在評定序列相似性之一方法中，以產生序列之間的最大程度之一致性的方式使兩個胺基酸或核苷酸序列比對。「一致性」係指胺基酸或核苷酸序列之不變程度。胺基酸序列及在某種程度上核苷酸序列之比對亦可考慮胺基酸（或核苷酸）中之保守差異及/或常見取代。保守差異為保留所涉及之殘基之物理化學特性之

差異。比對可為全局的（在序列之整個長度上且包括所有殘基之所比較序列之比對）或局部的（僅包括最相似區域之一部分序列之比對）。

「一致性」本身具有此項技術公認之意義且可使用所公開之技術來計算（參見例如：*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, 1988；*Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W.編, Academic Press, New York, 1993；*Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M.及 Griffin, H.G.編, Humana Press, New Jersey, 1994；*Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987；及 *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M.及 Devereux, J.編, M Stockton Press, New York, 1991）。雖然存在許多量測兩個多核苷酸或多肽之間的一致性之方法，但術語「一致性」為熟習此項技術者所熟知（Carillo, H. & Lipton, D., *SIAM J Applied Math* 48:1073 (1988)）。

如本文中所用，同源性（關於核酸及/或胺基酸序列）意謂約大於或等於 25% 序列同源性，典型地大於或等於 25%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90% 或 95% 序列同源性；必要時可說明精確百分比。出於本文中之目的，除非另外說明，否則術語「同源性」與「一致性」常常可互換使用。一般而言，為測定同源性或一致性百分比，比對序列以獲得最高程度之匹配（參見例如：*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M.編, Oxford University Press,

New York, 1988 ; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W. 編 , Academic Press, New York, 1993 ; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M.及 Griffin, H.G.編 , Humana Press, New Jersey, 1994 ; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; 及 *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M.及 Devereux, J.編 , M Stockton Press, New York, 1991 ; Carillo 等人(1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073) 。藉由序列同源性，保守胺基酸之數目可藉由標準比對演算程式來測定且可與由每一供應者所建立之預設空隙處罰一起使用。實質上同源之核酸分子始終沿所關注核酸之長度以中等嚴格度或高嚴格度典型雜交。亦涵蓋含有簡并密碼子來代替雜交核酸分子中之密碼子的核酸分子。

無論任何兩個分子具有至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%「同一性」或「同源性」之核苷酸序列或胺基酸序列，一致性或同源性可使用已知電腦算法，諸如使用如 Pearson 等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 中之預設參數之「FASTA」程式（其他程式包括 GCG 程式包（Devereux, J.等人, *Nucleic Acids Research* 12(1):387 (1984)）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Atschul, S.F.等人, *J Molec Biol* 215:403 (1990)；Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop 編, Academic Press, San Diego, 1994；及 Carillo 等人(1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073)）。舉例而言，國家生物技術資訊中心資料庫

(National Center for Biotechnology Information database) 之 BLAST 功能可用於測定一致性。其他市售或公開可用之程式包括 DNASTar 「MegAlign」 程式 (Madison, WI) 及威斯康星大學 (University of Wisconsin) Genetics Computer Group (UWG) 「Gap」 程式 (Madison WI)。蛋白質及/或核酸分子之同源性或一致性百分比可藉由例如使用 GAP 電腦程式比較序列資訊來測定 (例如 Needleman 等人 (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443 (如藉由 Smith 及 Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482) 所改編))。簡而言之, GAP 程式將相似性定義為相似之所比對符號 (亦即核苷酸或胺基酸) 的數目除以兩個序列中較短者中之總符號數目。GAP 程式之預設參數可包括: (1) 如由 Schwartz 及 Dayhoff 編, *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, National Biomedical Research Foundation, 第 353-358 頁 (1979) 所述, Gribskov 等人 (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745 之一元比較矩陣 (含有一致性之 1 值及非一致性之 0 值) 及加權比較矩陣; (2) 每一空隙 3.0 之處罰及每一空隙中之每一符號之額外 0.10 之處罰; 及 (3) 末端空隙無處罰。

因此, 如本文中所用, 術語「一致性」或「同源性」表示測試與參照多肽或多核苷酸之間的比較。如本文中所用, 術語「至少 90% 一致性」係指相對於多肽之參照核酸或胺基酸序列 90% 至 99.99% 之一致性百分比。90% 或 90% 以上程度之一致性指示下列事實, 假定出於例示之目的比較 100 個胺基酸長度之測試及對照多肽。測試多肽中不超

過 10% (亦即, 100 個胺基酸中有 10 個胺基酸) 之胺基酸與參照多肽中之胺基酸不同。可在測試多核苷酸與參照多核苷酸之間進行類似比較。該等差異可表現為隨機分布於多肽之整個長度範圍內之點突變或其可在不同長度之一或多個位置上叢集直至達到最大可容許差異, 例如 10/100 胺基酸差異 (約 90% 一致性)。差異係定義為核酸或胺基酸取代、插入或缺失。在同源度或一致度高於約 85%-90% 之情況下, 結果應獨立於程式及空隙參數組; 該種高一致度常常可藉由手動比對來容易地評定而不依靠軟體。

如本文中所用, 比對序列係指使用同源性 (相似性及/或一致性) 來比對核苷酸或胺基酸序列中之相應位置。典型地比對以 50% 或 50% 以上一致性相關之兩個或兩個以上序列。比對序列組係指在相應位置處比對之 2 個或 2 個以上序列且可包括與基因組 DNA 序列比對之源自 RNA 之比對序列 (諸如 EST 及其他 cDNA)。

如本文中所用, 「引子」係指可在合適緩衝液中且在合適溫度下於合適條件 (例如, 在 4 種不同核苷三磷酸及聚合劑 (諸如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶或反轉錄酶) 存在下) 下可充當模板引導型 DNA 合成之起始點的核酸分子。應瞭解, 某一核酸分子可用作「探針」及「引子」。然而, 引子具有 3' 羥基以供延長。引子可用於多種方法中, 包括例如聚合酶鏈反應 (PCR)、反轉錄酶 (RT) -PCR、RNA PCR、LCR、多重 PCR (multiplex PCR)、鍋柄式 PCR (panhandle PCR)、捕捉 PCR (capture PCR)、表現 PCR、3' 及 5' RACE、

原位 PCR、連接介導型 PCR 及其他擴增方案。

如本文中所用，「引子對」係指包括與待擴增（例如藉由 PCR）之序列之 5' 末端雜交的 5'（上游）引子及與待擴增序列之 3' 末端之互補序列雜交的 3'（下游）引子的一組引子。

如本文中所用，「特異性雜交」係指藉由核酸分子（例如寡聚核苷酸）與目標核酸分子之互補鹼基配對來黏接。熟習此項技術者熟悉影響特異性雜交之試管內及活體內參數，諸如特定分子之長度及組成。與試管內雜交尤其相關之參數進一步包括黏接及洗滌溫度、緩衝液組成及鹽濃度。移除非特異性結合之核酸分子之例示性洗滌條件在高嚴格度下為 0.1×SSPE、0.1% SDS、65°C 且在中等嚴格度下為 0.2×SSPE、0.1% SDS、50°C。等效嚴格度條件在此項技術中為已知的。熟習此項技術者可容易地調節此等參數來達成核酸分子與適於特定應用之目標核酸分子的特異性雜交。當提及兩個核苷酸序列時，互補意謂兩個核苷酸序列能夠雜交，其中對置核苷酸之間的錯配典型地小於 25%、15% 或 5%。必要時，說明互補性之百分比。典型地，兩個分子經選擇以使其在高嚴格度條件下雜交。

如本文中所用，實質上與產物相同意謂足夠相似以致所關注之特性充分保持不變使得實質上相同之產物可代替產物使用。

如本文中所用，亦應瞭解，術語「實質上相同」或「相似」隨如熟習相關技術者所理解之內容而變。

如本文中所用，對偶基因變異體或對偶基因變異係指佔據相同染色體位點之基因的兩種或兩種以上替代形式中之任一者。對偶基因變異天然地經由突變而發生且可引起群體內之表現型多型現象。基因突變可為沉默的（所編碼之多肽未發生變化）或可編碼具有改變之胺基酸序列的多肽。術語「對偶基因變異體」在本文中亦用於表示由基因之對偶基因變異體所編碼之蛋白質。基因之參照形式典型地編碼物種之群體或單個參照成員之多肽的野生型形式及/或主要形式。典型地，包括物種間及物種內之變異體的對偶基因變異體典型地與相同物種之野生型及/或主要形式具有至少 80%、90%或 90%以上之胺基酸一致性；一致度視基因而定且與比較為種間或種內比較無關。種內對偶基因變異體一般與野生型及/或主要形式具有至少約 80%、85%、90%或 95%或 95%以上之一致性，包括與多肽之野生型及/或主要形式具有 96%、97%、98%、99%或 99%以上之一致性。本文中對對偶基因變異體之提及一般係指相同物種之成員之間的蛋白質變異。

如本文中所用，在本文中可與「對偶基因變異體」互換使用之「對偶基因」係指基因或其部分之替代形式。對偶基因佔據同源染色體上之相同位點或位置。當個體具有基因之兩個相同對偶基因時，認為該個體關於彼基因或對偶基因為純合的。當個體具有基因之兩個不同對偶基因時，認為該個體關於該基因為雜合的。特定基因之對偶基因在單個核苷酸或若干核苷酸中可互不相同，且可包括核

苷酸之取代、缺失及插入。基因之對偶基因亦可呈含有突變之基因形式。

如本文中所用，物種變異體係指不同物種（包括不同哺乳動物物種，諸如小鼠及人類）間之多肽變異體。

如本文中所用，剪接變異體係指藉由對產生不只一種類型之 mRNA 的基因組 DNA 之初級轉錄物之分化加工所產生之變異體。

如本文中所用，修飾係指對多肽之胺基酸序列或核酸分子中之核苷酸序列之修飾，且分別包括胺基酸及核苷酸之缺失、插入及置換。修飾多肽之方法對於熟習此項技術者為常規的，諸如藉由使用重組 DNA 方法。

如本文中所用，術語啟動子意謂含有提供 RNA 聚合酶結合及轉錄開始之 DNA 序列的一部分基因。啟動子序列通常但不總是見於基因之 5' 非編碼區中。

如本文中所用，經分離或純化之多肽或蛋白質或其生物學活性部分實質上不含來自細胞或組織（蛋白質自其得到）之細胞物質或其他污染蛋白質，或實質上不含化學合成時之化學前驅體或其他化學物質。若如藉由熟習此項技術者所用之用於評定純度之標準分析方法（諸如薄層層析法（TLC）、凝膠電泳及高效液相層析法（HPLC））所測定，製劑似乎不含可易於偵測之雜質，或其足夠純以至進一步純化不會可偵測地改變該物質之物理及化學特性（諸如酶及生物活性），則可將製劑測定為實質上不含雜質的。用於純化化合物以產生實質上化學純化合物之方法為熟習此項

技術者所知。然而，實質上化學純化合物可為立體異構體之混合物。在該等情況下，進一步純化可增加化合物之比活性。

術語實質上不含細胞物質包括蛋白質製劑，其中蛋白質係自細胞之細胞組份所分離，蛋白質係自該等細胞所分離或以重組方式產生。在一具體實例中，術語實質上不含細胞物質包括酶蛋白質製劑，其具有小於約 30%（以乾重計）之非酶蛋白質（在本文中亦稱作污染蛋白質），一般小於約 20% 之非酶蛋白質或 10% 之非酶蛋白質或小於約 5% 之非酶蛋白質。當以重組方式產生酶蛋白質時，其亦實質上不含培養基，亦即培養基相當於酶蛋白質製劑體積之小於約或等於 20%、10% 或 5%。

如本文中所用，術語實質上不含化學前驅體或其他化學物質包括酶蛋白質製劑，其中蛋白質係自涉及該蛋白質合成之化學前驅體或其他化學物質所分離。該術語包括酶蛋白質製劑，該等酶蛋白質製劑具有小於約 30%（以乾重計）、20%、10%、5% 或 5% 以下之化學前驅體或非酶化學物質或組份。

如本文中所用，與合成有關之（例如）合成核酸分子或合成基因或合成肽係指藉由重組方法及/或藉由化學合成方法所產生之核酸分子或多肽分子。

如本文中所用，藉由使用重組 DNA 方法之重組方式進行製備意謂使用熟知之分子生物學方法來表現由選殖 DNA 編碼之蛋白質。

如本文中所用，載體（或質體）係指用於將異源核酸引入細胞中以使其表現或複製之分立元件。載體典型地保持為游離型，但可經設計以達成將基因或其部分整合至基因組之染色體中。亦涵蓋為人工染色體之載體，諸如酵母人工染色體及哺乳動物人工染色體。該等運載體之選擇及使用為熟習此項技術者所熟知。

如本文中所用，表現載體包括與調節序列（諸如啟動子區）操作性連接之能夠表現 DNA 的載體，該等調節序列能夠達成該等 DNA 片段之表現。該等額外鏈段可包括啟動子及終止子序列，且視情況可包括一或多個複製起點、一或多個可選擇標記、增強子、聚腺苷酸化信號及其類似物。表現載體一般源自質體或病毒 DNA 或可含有此兩者之元件。因此，表現載體係指重組 DNA 或 RNA 構築體，諸如質體、噬菌體、重組病毒或其他載體，其在引入合適宿主細胞後引起選殖 DNA 之表現。合適表現載體為熟習此項技術者所熟知且包括彼等在真核細胞及/或原核細胞中可複製之載體及彼等保持游離型之載體或彼等整合至宿主細胞基因組中之載體。

如本文中所用，載體亦包括「病毒載體」。病毒載體為操作性連接至外源基因以（作為運載體或穿梭載體）將外源基因轉移至細胞中之工程改造病毒。

如本文中所用，當提及 DNA 鏈段時，可操作地或操作性連接意謂該等鏈段經排列以使其功能與其預期目的相一致，例如轉錄在啟動子中開始且經由編碼鏈段進行至終止

子。

如本文中所用，術語評定意欲包括在獲得樣品中所存在之蛋白酶或其結構域 (domain) 之活性的絕對值的意義上且亦在獲得表明該活性程度之指數、比率、百分比、視覺或其他值之意義上之定量及定性測定。評定可為直接或間接的且實際上所偵測之化學物質當然無需為蛋白質水解產物自身，但可為例如其衍生物或一些其他物質。舉例而言，可諸如藉由 SDS-PAGE 及用庫馬斯亮藍 (Coomasie blue) 對蛋白質染色來偵測補體蛋白質之裂解產物。

如本文中所用，生物活性係指化合物之活體內活性或活體內投予化合物、組合物或其他混合物後所產生之生理反應。生物活性因此涵蓋該等化合物、組合物及混合物之治療作用及醫藥活性。生物活性可在經設計以測試或使用該等活性之試管內系統中進行觀察。因此，出於本文中之目的，蛋白酶之生物活性為其使多肽水解之催化活性。

如本文中所用，當提及兩個核酸序列時，等效意謂所討論之兩個序列編碼胺基酸或等效蛋白質之相同序列。當等效用於提及兩個蛋白質或肽時，其意謂兩個蛋白質或肽具有實質上相同之胺基酸序列而僅僅胺基酸取代不會實質上改變該蛋白質或肽之活性或功能。當等效係指特性時，該特性無需以相同程度呈現 (例如，兩個肽可展現相同類型酶促活性之不同速率)，但該等活性通常為實質上相同的。

如本文中所用，「調節」或「改變」係指諸如蛋白質之

分子之活性變化。例示性活性包括（但不限於）諸如信號轉導之生物活性。調節可包括活性增加（亦即，向上調節或促效活性）、活性降低（亦即，向下調節或抑制）或任何其他活性變化（諸如週期性、頻率、持續時間、動力學或其他參數之變化）。調節可視情況而變且典型地將調節與指定狀態相比擬，例如野生型蛋白質、處於構成狀態之蛋白質或如指定細胞類型或條件下所表現之蛋白質。

如本文中所用，組合物係指任何混合物。其可為溶液、懸浮液、液體、散劑、糊劑、水溶液、非水溶液或其任何組合。

如本文中所用，組合係指兩個或兩個以上項目之間或之中的任何聯合。組合可為兩個或兩個以上之分開項目（諸如兩個組合物或兩個集合），可為其混合物（諸如兩個或兩個以上項目之單個混合物）或其任何變體。組合之組份一般在功能上有關或相關。

如本文中所用，套組為視情況包括其他組份（諸如額外試劑）及該組合或其組份之使用說明書之經包裝組合。

如本文中所用，「疾病或病症」係指在有機體中由包括（但不限於）感染、後天病狀、遺傳病狀之原因或病狀所引起之病理病狀，且該病理病狀之特徵在於可識別之症狀。本文中所關注之疾病及病症為彼等可由免疫球蛋白治療之疾病及病症。

如本文中所用，「治療」具有疾病或病狀之個體意謂治療後個體之症狀部分或完全減輕或保持靜止狀態。因此，

治療涵蓋預防、治療及/或治癒。預防係指預防潛在疾病及/或預防症狀惡化或疾病進展。治療亦涵蓋本文中所提供之免疫球蛋白製劑及組合物之任何醫藥用途。

如本文中所用，醫藥學有效劑包括任何治療劑或生物活性劑，包括（但不限於）例如麻醉劑、血管收縮劑、分散劑、習知治療藥物（包括小分子藥物及治療性蛋白質）。

如本文中所用，治療意謂改善或以其他方式有利地改變病狀、病症或疾病或其他適應症之症狀的任何方式。

如本文中所用，治療作用意謂由個體治療所引起之改變、典型地改良或改善疾病或病狀之症狀或治癒疾病或病狀的作用。治療有效量係指向個體投予後產生治療作用之組合物、分子或化合物之量。

如本文中所用，術語「個體」係指動物，包括諸如人類之哺乳動物。

如本文中所用，患者係指人類個體。

如本文中所用，藉由諸如投予醫藥組合物或其他治療劑之治療來改善特定疾病或病症之症狀係指可歸因於投予組合物或治療劑或與投予組合物或治療劑有關之任何症狀減輕作用（無論持久或暫時的，持續或短暫的）。

如本文中所用，防止或預防係指降低疾病或病狀發生風險之方法。

如本文中所用，「治療有效量」或「治療有效劑量」係指至少足以產生治療作用之劑、化合物、物質或含有化合物之組合物之量。因此，其為預防、治癒、改善、抑制或

部分抑制疾病或病症之症狀所必需之量。

如本文中所用，單位劑型係指如此項技術中所知適用於人類及動物個體且經個別包裝之物理分立單元。

如本文中所用，單一劑量調配物係指用於直接投藥之調配物。

如本文中所用，「製品」為製成且出售之產品。如貫穿本申請案所使用，該術語意欲涵蓋包裝物品中所容納之 IG 及玻尿酸酶組合物。

如本文中所用，流體係指任何可流動之組合物。因此流體涵蓋呈半固體、糊劑、溶液、水性混合物、凝膠、洗劑、乳膏劑及其他該等組合物形式之組合物。

如本文中所用，「套組」係指本文中所提供之組合物與出於包括（但不限於）活化、投藥、診斷及評定生物活性或特性之目的之另一項目的組合。套組視情況包括使用說明書。

如本文中所用，細胞提取物或溶解產物係指由溶解或破裂之細胞製成之製劑或部分。

如本文中所用，動物包括任何動物，諸如（但不限於）包括人類、大猩猩及猴之靈長類動物；齧齒動物，諸如小鼠及大鼠；家禽，諸如雞；反芻動物，諸如山羊、母牛、鹿、羊；綿羊，諸如豬及其他動物。非人類之動物不包括人類作為所涵蓋之動物。本文中所提供之酶係來自任何來源（動物、植物、原核及真菌來源）。大部分酶具有包括哺乳動物起源之動物起源。

如本文中所用，對照係指除未用測試參數處理以外與測試樣品實質上相同之樣品，或者若其為血漿樣品，則其可來自未受所關注之病狀影響之正常志願者。對照亦可為內部對照。

如本文中所用，除非上下文另外清楚規定，否則單數形式「一」及「該」包括複數個指示物。因此，例如，對包含「細胞外域」之化合物之提及包括具有一個或複數個細胞外域之化合物。

如本文中所用，範圍及量可以「約」特定值或範圍之形式來表示。約亦包括精確量。因此「約 5 個鹼基」意謂「約 5 個鹼基」及「5 個鹼基」。

如本文中所用，「任選」或「視情況」意謂出現或不出現隨後所述之事件或情境，且該描述包括該事件或情境出現之情況及該事件或情境不出現之情況。舉例而言，視情況經取代之基團意謂該基團未經取代或經取代。

如本文中所用，除非另外指示，否則任何保護基團、胺基酸及其他化合物之縮寫係根據其一般用法、公認縮寫或 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會 (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) (參見 (1972) Biochem. 11:1726)。

B. 免疫球蛋白 (IG) 之皮下投藥

本文中提供治療 IG 可治療性疾病及病狀之方法及用途，其係藉由皮下投予與可溶性玻尿酸酶組合之免疫球蛋白 (IG)。因此，亦提供 IG 與可溶性玻尿酸酶之組合。藉

助於玻尿酸酶分解細胞外基質中之玻尿酸的能力，玻尿酸酶有助於治療劑之皮下輸注。免疫球蛋白為治療劑，其主要藉由靜脈內投予以治療具有免疫缺乏症之個體（稱作 IVIG 治療）加以給予。在玻尿酸酶存在下，IG 之生物可用率大於 IVIG 治療後 IG 之生物可用率之 90%。因此，在本文中所提供之方法及用途中，玻尿酸酶與 IG 之組合治療允許以類似於 IVIG 治療之劑量及頻率來皮下投予免疫球蛋白。因此，在本文中所提供之方法及用途中，當在可溶性玻尿酸酶存在下皮下投予時，對於特定適應症而言 IG 可以主要 IVIG 劑量每月一次投予。此外，因為玻尿酸酶用以開放皮膚中之流動通道，所以其可加快輸注速率。因此，皮下投予與玻尿酸酶共同調配及/或共同投予之 IG 的方法增加輸注速率且從而減少 IG 治療之傳遞時間。

缺陷型抗體形成為大多數原發性免疫缺乏（PID）疾病之最常見異常症狀；其最常反映於血清免疫球蛋白減少，其繼而尤其導致竇肺呼吸道對細菌感染之敏感性增加。在具有抗體缺乏（諸如 X-連結無 γ 球蛋白血症、免疫球蛋白重鏈缺失、選擇性免疫球蛋白 G（IgG）亞類缺乏、常見變異性免疫缺乏症或 X-連結高免疫球蛋白 M 症候群）之個體中發現免疫球蛋白含量減少。在具有歸因於 T 細胞及 B 細胞缺乏之複合免疫缺乏症（諸如（但不限於）嚴重複合免疫缺乏症或維斯科特-奧爾德裏奇症候群）之個體中亦發現免疫球蛋白含量減少（IUIS Scientific Committee, 1999）。

具有此等疾病之個體需要用免疫球蛋白產品進行替代

治療以防止或降低感染嚴重度。最初，免疫球蛋白替代治療係以肌肉內途徑給予，但 1981 年開始已藉由靜脈內 (IV) 途徑治療絕大多數患者。當前，美國之大多數免疫球蛋白產品係用於 IV 投予。然而，近年來已開發用於皮下投予之免疫球蛋白製劑 (Gardulf 等人 (2006) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 6: 434-42; Gardulf 等人 (2006) *J Clin. Immunol.*, 26: 177-85; Ochs 等人 (2006) *J Clin. Immunol.*, 26:265-73)。至少一種產品 Vivaglobin[®]經批准用於皮下投予。

目前使用之所有免疫球蛋白製劑係以 16% 來調配，相比而言，IVIG 製劑係以 5% 至 12% 來調配。相對於 IV 製劑之較高濃度使得輸注體積較小，該等製劑不可靜脈內輸注。免疫球蛋白替代治療之該等皮下方法視作安全有效且亦受到患者高度評估，因為其具有低全身性不良反應風險且引起與每月 IV 輸注相比較高之最低血清 IgG 濃度 (Gardulf 等人 (1995) *J Adv. Nurs.*, 21: 917-27; Gardulf 等人 (1993) *Clin. Exp. Immunol.*, 92: 200-4; Gardulf 等人 (1991) *Lancet*, 338: 162-6)。

皮下投予之免疫球蛋白之生物可用率一般小於靜脈內輸注之免疫球蛋白之生物可用率。免疫球蛋白可直接到達血液中，且經 3 至 5 日緩慢平衡至血管外代謝區 (Schiff 等人 (1986) *J. Clin. Immunol.*, 6:256-64)。皮下投予之免疫球蛋白自皮下空間緩慢吸收至血液中且同時與血管外代謝區平衡，不存在高 IV 峰值。未對生物可用率進行廣泛研究，

但在 ZLB-Behring 製劑 (亦即 Vivaglobin[®]) 之新近試驗中, 藉由量測曲線下面積 (AUC) 測定出僅 67% 之免疫球蛋白得到吸收且因此推薦劑量為 IV 劑量之 137% (Ochs 等人 (2006) *J Clin. Immunol.*, 26:265-73)。儘管比較 2 種不同投藥途徑及頻率之 AUC 存在技術困難, 但向家兔皮內投予免疫球蛋白之研究暗示經由皮下途徑存在降低之生物可用率。此可能歸因於大蛋白質分子之吸收模式, 其不能經由毛細管壁容易地擴散且必須經由淋巴管吸收 (Supersaxo 等人 (1990) *Pharm. Res.*, 7: 167-9)。

除與 IG 之皮下投藥有關之生物可用率問題以外, SC 投藥之主要缺點在於在每一部位中僅可輸注小體積, 使得以每週或每兩週 (每隔一週) 計需要使用多個部位。一般而言, 使用 16% 溶液時, 每部位可輸注約 20 ml; 且接受每公斤體重 (BW) 400 mg 之成人患者因此需要每週至少 3 個部位或每月 12 個部位。即使每週或每兩週投藥比每月 IV 輸注具有保持較佳之最低含量之附加優勢, 但對於許多患者而言多次針頭插入之要求已成為威懾因素。

SC 空間係由以凝膠狀物質 (玻尿酸) 填充之膠原蛋白網狀物形成。玻尿酸經約 5 h 之半衰期置換且主要負責阻礙流體流經組織。玻尿酸酶暫時消化玻尿酸, 從而促進輸注液進入皮下空間。玻尿酸在 24 小時內恢復, 未留下可觀察之變化。因此, 歸因於玻尿酸酶經由降解葡糖胺聚糖而開放間質空間中之通道的能力, 投予可溶性玻尿酸酶允許分子擴散, 從而改良該等共同調配或共同投予之分子之生物

可用率、藥物動力學及/或藥效學特徵。

在一些實例中，與玻尿酸酶皮下共同投予之 IG 之生物可用率為 IVIG 生物可用率之 70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%。生物可用率典型地大於 90%。此外，與可溶性玻尿酸酶共同投予允許在單個皮下部位處大體積輸注。舉例而言，可以單個坐姿在單個部位投予至多 600 ml 或更大體積之 IG，舉例而言，在單次投藥中可在單個部位投予 200 ml、300 ml、400 ml、500 ml、600 ml 或 600 ml 以上。因此，以等於或介於 5%-12% 之間調配之 IG 製劑可以等於每月一次 IVIG 劑量之劑量（例如等於或約為 100 mg/kg、200 mg/kg、300 mg/kg、400 mg/kg、500 mg/kg、600 mg/kg 或 600 mg/kg 以上）與可溶性玻尿酸酶皮下共同投予。因此，藉由在可溶性玻尿酸酶存在下皮下投予 IG，解決了與 IG 之皮下投藥相關之一種或全部顧慮及問題。因此，藉助於玻尿酸酶之擴散特性，在可溶性玻尿酸酶存在下皮下投予 IG 允許以每月一次 IVIG 頻率投予 IVIG 劑量，同時保持 IVIG 生物可用率。

以下章節描述本文中之組合中之例示性免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶，其製造方法及使用其治療 IG 可治療性疾病及病狀之方法。

C. 免疫球蛋白

本文中提供免疫球蛋白（IG，亦稱作 γ 球蛋白或 IgG），其可與可溶性玻尿酸酶組合用於皮下投藥。IG 用以藉由調節補體活性、抑制自體抗體產生、飽和或阻斷巨噬細胞及 B

淋巴細胞上之 Fc 受體及抑制諸如細胞因子、趨化因子及金屬蛋白酶之發炎性介體產生來增強免疫系統。

IG 為在高等動物血漿中發現之蛋白質片段且含有大量具有不同特異性之抗體。一般而言，IG 含有血清免疫球蛋白，其可為任何個體基因型（諸如 IgG）及各種亞類（IgA、IgM、IgD、IgE）。各種免疫球蛋白或亞類可以各種濃度及特異性存在，在免疫球蛋白製劑之間該等濃度及特異性可視例如血漿捐獻者對抗原之暴露（例如，藉由接種方式）而不同。免疫球蛋白常常以在血清中正常所見之量存在（參見表 2），但可使用純化步驟以改變特定免疫球蛋白類別之比率。IG 製劑典型地含有 90% 或 90% 以上之 IgG，諸如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上之 IgG。免疫球蛋白可為多株或單株的。製劑典型地包括高百分比之單體 IgG 及低 IgA 含量。

| Ig 類 | 血清含量 mg/ml (%) | 功能 |
|------|----------------|----------------|
| IgG | 1200 (77) | 人類之主要 Ig |
| IgA | 200 (13) | 保護黏膜 |
| IgM | 150 (9) | 用於初次免疫反應之主要 Ig |
| IgD | 2 (<1) | 調節 B 細胞 |
| IgE | <1 (痕量) | 過敏反應中之主要 Ig |

免疫球蛋白可自人類或動物血液分離或以其他方式產生，例如藉由重組 DNA 技術或融合瘤（hybridoma）技術製備。舉例而言，免疫球蛋白可使用任何合適分離程序（例如醇沈澱或離子交換分離）而自組織、淋巴細胞融合瘤培

養物、血漿或血清或重組細胞培養物獲得。一般而言，IG可自血漿藉由醇分餾來製備，該方法（諸如）最初由 Cohn 使用且由 Oncley 修改（柯恩-昂柯利（Cohn-Oncley）方法，參見例如 Cohn 等人(1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-475；Oncley 等人(1949) *J Am. Chem. Soc.*, 71: 541-550)。在純化中使用醇可使潛在污染病毒滅活。柯恩-昂柯利方法可使蛋白質變性且聚集，其可產生可用作抗體-抗原複合物之高分子量形式，該等抗體-抗原複合物具有自由固定補體之能力。

為防止該等不需要之作用，經修改之柯恩-昂柯利方法已經發展用於製備及純化 IG。各種該等程序為已知的且可經調適及修改以用於本文中之 IG 製備。鑒於此項技術中已知且可用之詳細方法，製備 IG 製劑係在此項技術之技術範圍內。典型地使用一級低溫乙醇分餾及二級分離來製造 IG，該等分離可包括化學修飾、在存在或不存在胃蛋白酶之情況下於 4.0 之 pH 下培育、PEG 沈澱、離子交換層析、酶促裂解、溶劑清潔劑處理及透濾及超濾中之任一或多者。

舉例而言，藉由習知技術（諸如超離心或排阻層析）分離 IG 聚集體使得獲得具有低抗補體活性之產物成為可能。IG 製備之其他方法包括（但不限於）藉助於乙二醇聚合物使人類血漿分離之方法（Polson 等人（1964）*Biochim. Biophys. Acta.*, 82: 463-475）；自由柯恩分離所分離之物質開始將聚乙二醇（PEG）作為純化劑併入（餾分 II 或 II+III，參見例如美國專利第 4,093,606 號及第 4,165,370 號）；及其他使用聚乙二醇之純化製程之類似方法（EP 0246579）。此

外，已描述用於獲得展現低抗補體活性之 IG 的方法，其係藉由用諸如胃蛋白酶、血纖維蛋白溶酶、固定化胰蛋白酶之酶處理、在中度酸性 pH 下處理、B-丙內酯處理、使用聚乙二醇作為沈澱劑之分離方法及美國專利第 4,093,606 號、第 4,126,605 號、第 3,966,906 號及第 4,124,576 中所述之其他技術來進行。其他方法係基於藉由用還原劑、醇化、烷基化及磺化處理 IG 分子而對 IG 分子之化學及部分修飾(參見例如美國專利第 6,875,848 號)。離子交換層析可用於自用於獲得 IG 製劑之起始物質消除不合需要之污染物(參見例如美國專利第 3,869,436 號、EP 91300790 及 WO 94/29334)。EP0440483 描述基於離子交換層析及在弱酸性 pH 下透濾而適用於促進靜脈內產品製備之技術組合。亦描述此項技術中之其他方法且其為熟習此項技術者所知(參見例如美國專利第 5,177,194 號及第 6,875,848 號)。

IG 製劑應經處理以移除病毒負荷。存在兩種降低病毒負荷之方法：病毒滅活及病毒分離或移除。使病毒滅活之例示性方法包括(但不限於)低溫乙醇分餾、加熱(巴氏殺菌(pasteurization))、溶劑/清潔劑及酸性環境(低 pH)。舉例而言，溶劑/清潔劑方法已經證明具有針對 VSV(水皰性口炎病毒)、辛得比斯病毒(Sindbis virus)、HIV、HBV(B 型肝炎病毒)及 HCV(C 型肝炎病毒)之殺病毒作用。例示性病毒分離或移除包括(但不限於)低溫乙醇分餾、相分離或 PEG 沈澱、親和層析、離子交換或凝膠排阻層析及過濾。

亦須製備最終經純化之調配物以避免過度聚集且使蛋白質穩定。可藉由製備經冷凍乾燥之製劑以改良儲存之穩定性來使 IG 製劑之聚集降至最低，該經冷凍乾燥之製劑在使用前用稀釋劑復水。在此項技術中熟知之增加 IG 製劑穩定性之另一方法為將蛋白質穩定賦形劑添加至 IG 製劑中。已知賦形劑包括（但不限於）糖、多元醇、胺基酸、胺、鹽、聚合物及界面活性劑。舉例而言，美國專利第 4,499,073 號描述經由選擇 pH 及離子強度進行穩定；日本專利 54020124 揭示將胺基酸添加至肌肉內製劑中以使其儲存穩定且安全；JP 57031623 及 JP 57128635 揭示在 5% 至 15% IG 製劑中使用精胺酸及/或離胺酸與 NaCl 以達成肌肉內製劑之長期穩定性；JP 4346934 揭示使用低電導率（小於毫姆歐）、5.3 至 5.7 之 pH 及包括 PEG、人血清白蛋白及甘露醇之任選的一或多種穩定劑；US 4,439,421 教示添加親水性巨分子、多元醇、及另一蛋白質以穩定而防止抗補體產生；U.S. 5,945,098 揭示若藉由添加胺基酸（0.1 M 至 0.3 M 甘胺酸）及非離子型清潔劑（聚山梨醇酯及 PEG）使其成為等張溶液則穩定；US 4,186,192 揭示包括胺基酸之各種添加劑；WO 2005/049078 揭示用麥芽糖及另外達到 0.1 M 之甘胺酸進行穩定；US 4,362,661 揭示使用中性及鹼性胺基酸來將穩定性賦予 5% IG 製劑。亦可製備穩定液體調配物，其使用具有極低離子強度及 4.25 之 pH（美國專利第 4,396,608 號）或 5-6 之弱酸性 pH（EP 0278422）之水性介質中的碳水化合物。

亦可控制 IG 製劑之二聚體形成。舉例而言，美國專利第 5,871,736 號揭示 IG 製劑（尤其液體製劑）含有一或多種兩親媒性穩定劑以使其穩定而防止二聚體形成。兩親媒性穩定劑包括菸鹼酸及其衍生物，特定而言菸鹼醯胺，及主要連同上述穩定劑之具有不帶電之親脂性側鏈之胺基酸，例如苯丙胺酸、甲硫胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸及纈胺酸。

製劑可藉由諸如本文中所述之任何方法的此項技術中已知之方法來製備。然而，一般可將最終製劑之 pH 調節至相對較高但仍為酸性 pH，亦即處於約 4.2 至 5.4 之 pH 範圍內，諸如 4.6 至 5.1 之 pH 範圍。已發現此 pH 範圍尤其適用於改良 IG 製劑之儲存。

最終 IG 製劑一般具有約 5% 至 25% w/v、一般 6% 至 15% w/v、8% 至 12% w/v 且典型地 10% w/v 之蛋白質濃度。最終蛋白質濃度視各種因素而定，諸如投藥途徑、待治療之患者及待治療之病狀類型。

在本文中亦預期任何用於 IV 投藥之 IG 製劑可與可溶性玻尿酸酶組合用於本文中所提供之方法中以供皮下投藥。製劑包括冷凍乾燥及液體調配物。免疫球蛋白（IVIG）為市售的，如 Carimune[®] NF、Flebogamma[®] 5%、Gammagard[®] Liquid、Gammagard[®] S/D、Gamunex[®]、Iveegam[®] EN、Octagam[®] 及 Polygam[®] S/D。該等製劑典型地皆使用低溫醇分餾方法，但使用不同之使免疫球蛋白分離且純化之方法及不同之減少潛在病毒污染之方法。此外，目前經調配用

於肌肉內或皮下投藥之其他製劑可用於本文中所提供之組合及方法中。

例示性 IG 製劑為 10% 免疫球蛋白靜脈內注射劑(人類) (IVIG, 10%, 以 Gammagard[®] 液體出售, Baxter Healthcare 公司), 其為 IgG 亞類分布類似於正常血漿之 IgG 亞類分布的未經修飾之液體 IgG 製劑。該製劑含有完整可結晶片段 (Fc) 及 Fab 區。製劑含有 100 mg/ml 蛋白質, 其中至少 98% 為 IgG; IgA 係以 37 μ g/ml 之濃度存在且 IgM 僅以痕量存在。其具有類似於生理滲透壓度之滲透壓度且不含所添加之糖、鈉或防腐劑。其與甘胺酸一起調配以在 4.6 至 5.1 之 pH 下穩定。製造方法使用經修改之柯恩-昂柯利低溫醇分餾程序且經由使用弱陽離子交換層析及弱陰離子交換層析之連續方法來進一步純化。製造方法亦包括 3 個獨立之病毒滅活或移除步驟: 溶劑/清潔劑 (S/D) 處理、奈米過濾及在低 pH 及高溫下培育。

D. 玻尿酸酶

本文中提供含有免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶之組合及使用用於皮下投藥之該等組合來治療 IG 介導性疾病及病狀之方法。玻尿酸酶為降解玻尿酸之酶家族, 玻尿酸為細胞外基質之基本組份及間質障壁之主要成份。藉由催化玻尿酸 (間質障壁之主要成份) 水解, 玻尿酸酶降低玻尿酸黏性, 從而增加組織滲透性。因而, 玻尿酸酶已例如作為展布劑或分散劑而連同其他劑、藥物及蛋白質一起使用以增強該等劑、藥物及蛋白質之分散及傳遞。本文中所提供

之組合及方法中之例示性玻尿酸酶為可溶性玻尿酸酶。

存在三種一般類別之玻尿酸酶：哺乳動物玻尿酸酶、細菌玻尿酸酶及來自水蛭、其他寄生蟲及甲殼類動物之玻尿酸酶。哺乳動物型玻尿酸酶 (EC 3.2.1.35) 為內- β -N-乙酰基-己糖胺酶，其將玻尿酸之 $\beta 1 \rightarrow 4$ 糖苷鍵水解成各種寡糖長度 (諸如四糖及六糖)。哺乳動物型玻尿酸酶具有水解及轉糖苷酶活性，且可降解玻尿酸及硫酸軟骨素 (CS) (一般為 C4-S 及 C6-S)。此類型之玻尿酸酶包括 (但不限於) 來自母牛 (牛) (SEQ ID NO:10 及 11)、小鼠 (SEQ ID NO:17-19、31)、豬 (SEQ ID NO:20-21)、大鼠 (SEQ ID NO:22-24、30)、家兔 (SEQ ID NO:25)、羊 (綿羊) (SEQ ID NO:26 及 27)、猩猩 (SEQ ID NO:28)、獼猴 (SEQ ID NO:29)、豚鼠 (SEQ ID NO:32) 之玻尿酸酶及人類玻尿酸酶。

哺乳動物玻尿酸酶可進一步再分為中性活性玻尿酸酶 (主要見於睪丸提取物中) 及酸性活性玻尿酸酶 (主要見於諸如肝臟之器官中)。例示性中性活性玻尿酸酶包括 PH20，包括 (但不限於) 源自諸如綿羊 (SEQ ID NO:27)、牛 (SEQ ID NO:11) 及人類 (SEQ ID NO:1) 之不同物種之 PH20。人類 PH20 (亦稱作 SPAM1 或精子表面蛋白 PH20) 一般經由糖基磷脂醯肌醇 (GPI) 錨而鎖定至質膜。其自然地涉及精子-卵子黏著且藉由消化玻尿酸以協助精子穿透卵丘細胞層。PH20 mRNA 轉錄物通常經轉譯以產生 509 個胺基酸之前驅多肽 (SEQ ID NO:1)，其含有處於 N 末端處之

35 個胺基酸信號序列 (1-35 胺基酸殘基位置) 及處於 C 末端之 19 個胺基酸 GPI 錨 (491-509 胺基酸殘基位置)。成熟 PH20 因此為 SEQ ID NO:2 中所闡明之 474 個胺基酸之多肽。牛 PH20 為 553 個胺基酸之前驅多肽 (SEQ ID NO:11)。將牛 PH20 與人類 PH20 比對僅展示微弱之同源性，在牛多肽中歸因於不存在 GPI 錨而存在自 470 位胺基酸直至各別羧基末端之多個缺口 (參見例如 Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440)。事實上，預計除人類以外在任何其他 PH20 種類中均無明確 GPI 錨。因此，自綿羊及牛產生之 PH20 多肽以可溶解形式存在。雖然牛 PH20 以極鬆散地附接至質膜之形式存在，但其並非經由磷脂酶敏感性錨來錨定 (Lalancette 等人, Biol Reprod. 2001 年 8 月;65(2):628-36.)。牛玻尿酸酶之此獨特特徵允許以提取物形式使用可溶性牛睪丸玻尿酸酶以供臨床使用 (Wydase™、Hyalase™)。

除人類 PH20 (亦稱作 SPAM1) 以外，在人類基因組中已識別 5 種玻尿酸酶樣基因，亦即 HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4 及 HYALP1。HYALP1 為假基因，且 HYAL3 (SEQ ID NO:38) 不展示具有針對任何已知受質之酶活性。HYAL4 (SEQ ID NO:39 中所闡明之前驅多肽) 為軟骨素酶 (chondroitinase) 且幾乎不展現針對玻尿酸之活性。HYAL1 (SEQ ID NO:36 中所闡明之前驅多肽) 為原型酸性-活性酶且 PH20 (SEQ ID NO:1 中所闡明之前驅多肽) 為原型中性-活性酶。諸如 HYAL1 及 HYAL2 (SEQ ID NO:37 中所闡明

之前驅多肽)之酸性-活性玻尿酸酶在中性 pH(亦即 pH=7)下一般缺乏催化活性。舉例而言, HYAL1 在 4.5 之 pH 下幾乎不具有試管內催化活性 (Frost 等人 (1997) *Anal. Biochemistry*, 251:263-269)。HYAL2 為酸性-活性酶, 其具有極低之試管內比活性。玻尿酸酶樣酶之特徵亦在於彼等一般經由糖基磷脂醯肌醇錨鎖定至質膜之酶 (諸如人類 HYAL2 及人類 PH20) (Danilkovitch-Miagkova 等人 (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(8):4580-5) 及彼等一般可溶解之酶 (諸如人類 HYAL1) (Frost 等人, (1997) *Biochem Biophys Res Commun*. 236(1):10-5)。

一些玻尿酸酶之糖基化 (包括 N 及 O 連接之糖基化) 對於其催化活性及穩定性為極重要的。雖然改變修飾醣蛋白之多醣類型可對蛋白質之抗原性、結構摺疊、溶解性及穩定性具有顯著影響, 但不認為大部分酶需要糖基化以達到最佳酶活性。該等玻尿酸酶在此方面為獨特的, 因為移除 N 連接之糖基化可使玻尿酸酶活性近乎完全鈍化。對於該等玻尿酸酶而言, N 連接多醣之存在對於產生活性酶為關鍵性的。

N 連接寡醣分為若干主要類型 (寡甘露糖型、複合型、雜合型、硫酸化型), 其均具有經由屬於 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 序列 (其中 Xaa 不為 Pro) 之 Asn 殘基之醯胺氮所連接之 (Man)₃-GlcNAc-GlcNAc-核心。對於凝血蛋白 C 已報導在 -Asn-Xaa-Cys- 位點處之糖基化。在一些情況下, 玻尿酸酶可含有 N-醣苷鍵及 O-醣苷鍵。舉例而言, PH20 具有 O 連

接寡糖以及 N 連接寡糖。

在 SEQ ID NO : 1 中所例示之人類 PH20 之 N82、N166、N235、N254、N368、N393、N490 處存在 7 個潛在 N 連接糖基化位點。半胱胺酸殘基 C60 與 C351 之間及 C224 與 C238 之間形成二硫鍵以形成核心玻尿酸酶結構域。然而，對於中性酶催化活性而言，在羧基末端需要額外之半胱胺酸以使 SEQ ID NO:1 之 36 位至 464 位胺基酸含有最小活性之人類 PH20 玻尿酸酶結構域。因此，對於合適玻尿酸酶活性而言不需要 N 連接糖基化位點 N-490。

可溶性玻尿酸酶

在本文中之組合及方法中提供可溶性玻尿酸酶。可溶性玻尿酸酶包括任何以可溶解形式存在之玻尿酸酶，包括（但不限於）Hyal1、牛 PH20 及綿羊 PH20、其對偶基因變異體及其他變異體。在可溶性玻尿酸酶中亦包括任何經修飾而具有可溶性之玻尿酸酶。舉例而言，通常經由 GPI 錨而與膜錨定之人類 PH20 可藉由截短且移除 C 末端處之全部或一部分 GPI 錨來製成可溶性人類 PH20。可溶性玻尿酸酶亦包括中性活性及酸性活性玻尿酸酶，然而，出於皮下投藥之目的，中性活性玻尿酸酶預期用於本文中。

因此，只要玻尿酸酶為可溶解的且保持玻尿酸酶活性，則例示性可溶性玻尿酸酶為來自任何物種之 PH20，諸如在 SEQ ID NO : 1、2、11、25、27、30 及 31 中之任一者中所闡明之任何玻尿酸酶或其缺乏全部或一部分 C 末端 GPI 錨之截短形式。在可溶性玻尿酸酶中亦包括 SEQ ID NO :

1、2、11、25、27、30 及 31 中之任一者之對偶基因變異體或其他變異體或其截短形式。對偶基因變異體及其他變異體為熟習此項技術者所知且包括與 SEQ ID NO : 1、2、11、25、27、30 及 31 中之任一者具有 60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95% 或 95% 以上序列一致性之多肽或其截短形式。

為用於本文中之方法中，典型地使用可溶性人類 PH20。儘管可使用來自其他動物之 PH20，但因為該等製劑為動物蛋白質，所以其潛在具有免疫原性。舉例而言，顯著比例之患者表現繼發於所攝取食物之前期致敏，且因為此等製劑為動物蛋白質，所以所有患者皆具有後繼致敏之風險。因此，非人類製劑可能不適用於長期使用。若需要非人類製劑，則在本文中預期該等多肽可經製備以具有降低之免疫原性。該等修飾係在熟習此項技術者之技術範圍內。用於本文中之方法中的包括 PH20 之玻尿酸酶可以重組方式製備或可自天然來源（諸如自睪丸提取物）純化或部分純化。

可溶性人類 PH20

例示性可溶性玻尿酸酶為可溶性人類 PH20。已製備重組人類 PH20 之可溶解形式且其可用於本文中所述之方法中以與免疫球蛋白共同投予或共同調配以用於皮下投藥來治療 IG 可治療性疾病及病狀。PH20 之該等可溶解形式之製備係描述於申請案第 11/065,716 號及第 11/238,171 號中且描述於以下實例 2-6 中。可溶解形式包括（但不限於）任何

具有 C 末端截短以產生含有 SEQ ID NO: 1 中所闡明之胺基酸序列之 1 位胺基酸至 347、372、394、413、430、447、467、477、478、479、480、481、482 及 483 位胺基酸之多肽的玻尿酸酶。當在哺乳動物細胞中表現時，在加工期間使 35 個胺基酸之 N 末端信號序列裂解且分泌蛋白質之成熟形式。因此，成熟可溶性多肽含有 SEQ ID NO:1 之 36 位胺基酸至 347、372、394、413、430、447、467、477、478、479、480、481、482 及 483 位胺基酸。終止於 477 至 483 位胺基酸位置之缺失突變體（對應於 SEQ ID NO:1 中所闡明之前驅多肽）展現高於全長 GPI 錨定形式之分泌性玻尿酸酶活性。因此，例示性可溶性玻尿酸酶為長度為 442、443、444、445、446 或 447 個胺基酸之彼等玻尿酸酶（諸如 SEQ ID NO:4-9 中之任一者中所闡明之玻尿酸酶）或其對偶基因變異體或物種變異體或其他變異體。一般而言，PH20 之可溶解形式可使用蛋白表現系統來製備，該等蛋白表現系統有助於校正 N-糖基化以確保多肽保持活性，因為糖基化對於玻尿酸酶之催化活性及穩定性而言十分重要。該等細胞包括例如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞（例如 DG44 CHO 細胞）。

重組可溶性人類 PH20 (rHuPH20)

已產生重組可溶解形式之人類 PH20(可溶性 rHuPH20) 且可使用本文中所述之方法對其製備及純化。rHuPH20 之該等可溶解形式之產生係描述於美國專利申請案第 11/065,716 號及第 11/238,171 號(以美國公開專利申請案第

US20050260186 號及第 US 20060104968 號公開) 中且描述於以下實例 2-6 中。該等多肽之例示性多肽為彼等自編碼 SEQ ID NO:3 中所闡明之 1-482 位胺基酸之核酸分子所產生的多肽。轉譯後加工移除 35 個胺基酸之信號序列，使 447 個胺基酸之可溶性 rHuPH20 (SEQ ID NO:4) 分泌。由於在製備及純化後肽酶存在於培養基中，所以所得之經純化之 rHuPH20 可為異質的。典型地，rHuPH20 係在有助於校正 N-糖基化以保持活性之細胞中產生，諸如 CHO 細胞 (例如 DG44 CHO 細胞)。

E. 產生編碼可溶性玻尿酸酶及其多肽之核酸之方法

本文中所闡明之可溶性玻尿酸酶之多肽可藉由此項技術中熟知之用於蛋白質純化及重組蛋白質表現之方法來獲得。可使用任何為熟習此項技術者所知用於識別編碼所需基因之核酸之方法。此項技術中可用之任何方法可用於自諸如細胞或組織來源獲得編碼玻尿酸酶之全長 (亦即，涵蓋整個編碼區) cDNA 或基因組 DNA 純系。可藉由 (諸如) 定位突變而自野生型多肽工程改造經修飾或變異之可溶性玻尿酸酶。

可使用此項技術中已知用於選殖及分離核酸分子之任何可用方法來選殖或分離多肽。該等方法包括核酸之 PCR 擴增及包括核酸雜交篩選、基於抗體之篩選及基於活性之篩選的文庫篩選。

用於核酸擴增之方法可用於分離編碼所需多肽之核酸分子，該等方法包括例如聚合酶鏈反應 (PCR) 法。含有核

酸之物質可用作起始物質，可自其分離所需之編碼多肽之核酸分子。舉例而言，DNA 及 mRNA 製劑、細胞提取物、組織提取物、流體樣品（例如血液、血清、唾液）、來自健康及/或患病個體之樣品可用於擴增方法中。核酸文庫亦可用作起始物質來源。引子可經設計以使所需多肽擴增。舉例而言，引子可基於自其產生所需多肽之所表現序列來設計。引子可基於多肽胺基酸序列之反轉譯（back-translation）來設計。藉由擴增所產生之核酸分子可經定序及確認以編碼所需多肽。

額外核苷酸序列可連接至編碼多肽之核酸分子，包括出於將合成基因選殖至載體中之目的含有限制性核酸內切酶位點之連接子序列，該載體為例如蛋白質表現載體或經設計以用於使編碼核心蛋白質之 DNA 序列擴增之載體。此外，指定功能性 DNA 元件之額外核苷酸序列可與編碼多肽之核酸分子操作性連接。該等序列之實例包括（但不限於）經設計以促進細胞內蛋白質表現之啟動子序列及經設計以促進蛋白質分泌之例如異源信號序列之分泌序列。該等序列為熟習此項技術者所知。諸如指定蛋白質結合區域之鹼基序列之額外核苷酸殘基序列亦可連接至編碼酶之核酸分子。該等區域包括（但不限於）促進或編碼有助於酶吸收至特定標靶細胞中，或以其他方式改變合成基因產物之藥物動力學的蛋白質的殘基序列。舉例而言，酶可連接至 PEG 部分。

另外，可添加標籤或其他部分（例如）以協助多肽之

偵測或親和純化。舉例而言，諸如指定 (specifying) 抗原決定基標籤或其他可偵測標記之鹼基序列之額外核苷酸殘基序列亦可與編碼酶之核酸分子連接。該等序列之例示性序列包括編碼 His 標籤 (例如，6×His，HHHHHH；SEQ ID NO:54) 或 Flag 標籤 (DYKDDDDK；SEQ ID NO:55) 之核酸序列。

所識別及分離之核酸接著可插入合適之選殖載體中。可使用此項技術中已知之大量載體-宿主系統。可能的載體包括 (但不限於) 質體或經修飾之病毒，但載體系統須與所使用之宿主細胞相容。該等載體包括 (但不限於) 噬菌體 (諸如 λ 衍生物) 或質體 (諸如 pCMV4、pBR322 或 pUC 質體衍生物或 Bluescript 載體 (Stratagene, La Jolla, CA))。其他表現載體包括本文中所例示之 HZ24 表現載體。插入選殖載體中可例如伴隨有將 DNA 片段接合至具有互補黏性末端之選殖載體中。插入可使用 TOPO 選殖載體 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) 來達成。若在選殖載體中不存在用於將 DNA 分段之互補限制性位點，則可用酶修飾 DNA 分子末端。或者，可藉由將核苷酸序列 (連接子) 接合至 DNA 末端上來產生所需之任何位點；此等所接合之連接子可含有編碼限制性核酸內切酶識別序列之特異性化學合成之寡聚核苷酸。在一替代方法中，所裂解之載體及蛋白質基因可藉由均聚物加尾來修飾。重組分子可經由例如轉型、轉染、感染、電穿孔及超音波穿孔 (sonoporation) 而引入宿主細胞中以產生基因序列之許多複本。

在特定具體實例中，用合併有所分離之蛋白基因、cDNA 或合成 DNA 序列之重組 DNA 分子使宿主細胞轉型能夠產生基因之多個複本。因此，基因可藉由使轉型體生長、自轉型體分離重組 DNA 分子及必要時自所分離之重組 DNA 擷取所插入之基因來大量獲得。

1. 載體及細胞

為使諸如本文中所述之任何蛋白質之所需蛋白質中的一或多者重組表現，可將含有所有或一部分編碼該蛋白質之核苷酸序列的核酸插入合適表現載體中，亦即該載體含有所插入之蛋白質編碼序列轉錄及轉譯所需之元件。必需之轉錄及轉譯信號亦可由酶基因之天然啟動子及/或其側接區來提供。

亦提供含有編碼酶之核酸的載體。亦提供含有載體之細胞。細胞包括真核細胞及原核細胞且載體為任何適用於細胞中之載體。

提供含有載體之包括內皮細胞之原核及真核細胞。該等細胞包括細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、古生菌 (Archea)、植物細胞、昆蟲細胞及動物細胞。藉由使上述細胞在使細胞表現所編碼之蛋白質的條件下生長且回收所表現之蛋白質來使用該等細胞產生其蛋白質。出於本文中之目的，舉例而言，酶可分泌至培養基中。

提供含有編碼可溶性玻尿酸酶多肽之核苷酸序列之載體，該核苷酸序列係偶接至天然或異源信號序列以及其多個複本。載體可經選擇以在細胞中表現酶蛋白或使得酶蛋

白以分泌性蛋白質形式表現。

多種宿主-載體系統可用於表現蛋白質編碼序列。此等系統包括（但不限於）感染病毒（例如牛痘病毒、腺病毒及其他病毒）之哺乳動物細胞系統；感染病毒（例如桿狀病毒）之昆蟲細胞系統；諸如含有酵母載體之酵母的微生物；或用噬菌體、DNA、質體 DNA 或黏接質體 DNA 轉型之細菌。載體之表現元件在其強度及特異性方面不同。視所用之宿主-載體系統而定，可使用許多合適轉錄及轉譯元件中之任一者。

熟習此項技術者已知用於將 DNA 片段插入載體中之任何方法可用於構建含有嵌合基因之表現載體，該嵌合基因含有合適之轉錄/轉譯控制信號及蛋白質編碼序列。此等方法可包括試管內重組 DNA 及合成技術及活體內重組物（遺傳重組）。編碼蛋白質或其結構域、衍生物、片段或同系物之核酸序列之表現可藉由第二核酸序列來調節使得其基因或片段在用重組 DNA 分子轉型之宿主中得到表現。舉例而言，可藉由此項技術中已知之任何啟動子/增強子來控制蛋白質表現。在一特定具體實例中，啟動子不為所需蛋白質之基因自身所具有的。可使用之啟動子包括（但不限於）SV40 早期啟動子（Bernoist 及 Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)）、勞氏肉瘤病毒（Rous sarcoma virus）之 3'長末端重複中所含有之啟動子（Yamamoto 等人 *Cell* 22:787-797 (1980)）、疱疹胸苷激酶啟動子（Wagner 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)）、金屬硫蛋白基因之調

節序列 (Brinster 等人, *Nature* 296:39-42 (1982)); 原核表現載體, 諸如 β -內醯胺酶啟動子 (Jay 等人, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5543) 或 *tac* 啟動子 (DeBoer 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)); 亦參見「Useful Proteins from Recombinant Bacteria」: *Scientific American* 242:79-94 (1980)中); 含有胭脂鹼 (nopaline) 合成酶啟動子之植物表現載體 (Herrera-Estrella 等人, *Nature* 303:209-213 (1984)) 或花椰菜嵌紋病毒 (cauliflower mosaic virus) 35S RNA 啟動子 (Gardner 等人, *Nucleic Acids Res.* 9:2871 (1981)) 及光合成酶雙磷酸核酮糖羧化酶之啟動子 (Herrera-Estrella 等人, *Nature* 310:115-120 (1984)); 諸如 Gal4 啟動子之來自酵母及其他真菌之啟動子元件、醇脫氫酶啟動子、磷酸甘油激酶啟動子、鹼性磷酸酶啟動子; 及展現組織特異性且已用於轉殖基因動物中之下列動物轉錄控制區: 在胰腺腺泡細胞中具有活性之彈性蛋白酶 I 基因控制區 (Swift 等人, *Cell* 38:639-646 (1984); Ornitz 等人, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987))、在胰腺 β 細胞中具有活性之胰島素基因控制區 (Hanahan 等人, *Nature* 315:115-122 (1985))、在淋巴樣細胞中具有活性之免疫球蛋白基因控制區 (Grosschedl 等人, *Cell* 38:647-658 (1984); Adams 等人, *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander 等人, *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987))、在睪丸、乳房、淋巴及肥大細胞中具有活性之小鼠乳房腫瘤病毒控制區 (Leder

等人, *Cell* 45:485-495 (1986))、在肝中具有活性之白蛋白基因控制區 (Pinckert 等人, *Genes and Devel.* 1:268-276 (1987))、在肝中具有活性之 α -胎蛋白基因控制區 (Krumlauf 等人, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer 等人, *Science* 235:53-58 (1987))、在肝中具有活性之 α -1 抗胰蛋白酶基因控制區 (Kelsey 等人, *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987))、在骨髓細胞中具有活性之 β 球蛋白基因控制區 (Magram 等人, *Nature* 315:338-340 (1985); Kollias 等人, *Cell* 46:89-94 (1986))、在腦之寡樹突神經膠質細胞中具有活性之髓鞘鹼性蛋白基因控制區 (Readhead 等人, *Cell* 48:703-712 (1987))、在骨骼肌中具有活性之肌凝蛋白輕鏈-2 基因控制區 (Shani, *Nature* 314:283-286 (1985)) 及在丘腦下部之促性腺激素細胞中具有活性之促性腺釋放激素基因控制區 (Mason 等人, *Science* 234:1372-1378 (1986))。

在一特定具體實例中，使用含有與編碼所需蛋白質或其結構域、片段、衍生物或同系物之核酸操作性連接之啟動子、一或多個複製起點及視情況一或多個可選擇標記（例如抗生素耐藥基因 (antibiotic resistance gene)）的載體。用於轉型大腸桿菌 (*E. coli*) 細胞之例示性質體載體包括例如 pQE 表現載體（可自 Qiagen, Valencia, CA 得到；亦參見由 Qiagen 發表之描述該系統之文獻）。pQE 載體具有噬菌體 T5 啟動子（由大腸桿菌 RNA 聚合酶識別）及雙 lac 操縱基因阻遏模組（以提供重組蛋白質於大腸桿菌中之緊密調節之高程度表現）、用於有效轉譯之合成核糖體結合位點 (RBS

II)、6×His 標籤編碼序列、 t_0 及 T1 轉錄終止子、ColE1 複製起點及用於賦予安比西林 (ampicillin) 耐藥性之 β -內醯胺酶基因。pQE 載體使 6×His 標籤能夠安置於重組蛋白質之 N 末端或 C 末端處。該等質體包括 pQE 32、pQE 30 及 pQE 31，其提供用於所有三個閱讀框架之多個選殖位點且使 N 末端 6×His-標記之蛋白質得到表現。用於轉型大腸桿菌細胞之其他例示性質體載體包括例如 pET 表現載體 (參見美國專利 4,952,496；可自 NOVAGEN, Madison, WI 得到；亦參見由 Novagen 發表之描述該系統之文獻)。該等質體包括 pET 11a，其含有 T7lac 啟動子、T7 終止子、誘導性大腸桿菌 lac 操縱基因及 lac 阻遏基因；pET 12a-c，其含有 T7 啟動子、T7 終止子及大腸桿菌 ompT 分泌信號；及 pET 15b 及 pET19b (NOVAGEN, Madison, WI)，其含有用於使用 His 管柱純化之 His-TagTM 前導序列及在經由管柱純化後允許裂解之凝血酶裂解位點、T7-lac 啟動子區及 T7 終止子。

用於哺乳動物細胞表現之例示性載體為 HZ24 表現載體。HZ24 表現載體係源自 pCI 載體骨架 (Promega)。其含有編碼 β -內醯胺酶耐藥基因 (AmpR) 之 DNA、F1 複製起點、細胞巨大病毒即刻早期增強子/啟動子區 (CMV) 及 SV40 晚期聚腺苷酸化信號 (SV40)。表現載體亦具有來自 ECMV 病毒 (Clontech) 之內部核糖體進入位點 (IRES) 及小鼠二氫葉酸還原酶 (DHFR) 基因。

2. 表現

可藉由熟習此項技術者已知之包括活體內及試管內方

法之任何方法來製備可溶性玻尿酸酶多肽。所需蛋白質可表現於適於產生所需量及形式之該等蛋白質（諸如為投藥及治療所需）之任何有機體中。表現宿主包括原核及真核有機體，諸如大腸桿菌、酵母、植物、昆蟲細胞、哺乳動物細胞（包括人類細胞系及轉殖基因動物）。表現宿主可在其蛋白質產生量以及所表現蛋白質上所存在之轉譯後修飾類型方面有所不同。可基於此等因素及諸如調節及安全考慮、製備成本及純化需要及方法之其他因素來對表現宿主進行選擇。

許多表現載體為可得到的且為熟習此項技術者所知且可用於表現蛋白質。表現載體之選擇受宿主表現系統之選擇影響。一般而言，表現載體可包括轉錄啟動子及任選之增強子、轉譯信號及轉錄及轉譯終止信號。用於穩定轉型之表現載體典型地具有允許選擇及維持經轉型細胞之可選擇標記。在一些狀況下，複製起點可用於擴增載體之複本數。

可溶性玻尿酸酶多肽亦可以蛋白質融合形式使用或表現。舉例而言，可產生酶融合以將額外功能添加至酶。酶融合蛋白質之實例包括（但不限於）信號序列、諸如用於定位之標籤（例如 his₆ 標籤或 myc 標籤）或用於純化之標籤（例如 GST 融合）及用於引導蛋白質分泌及/或膜結合之序列的融合。

a. 原核細胞

原核生物（尤其大腸桿菌）提供用於產生大量蛋白質

之系統。大腸桿菌之轉型為熟習此項技術者所熟知之簡單且快速之技術。大腸桿菌之表現載體可含有誘導性啟動子，該等啟動子適用於誘導高程度之蛋白質表現且適用於表現對宿主細胞展現某些毒性之蛋白質。誘導性啟動子之實例包括 lac 啟動子、trp 啟動子、雜合 tac 啟動子、T7 及 SP6 RNA 啟動子及溫度調節性 λ PL 啟動子。

諸如本文中所提供之任何蛋白質之蛋白質可表現於大腸桿菌之細胞質環境中。細胞質為還原性環境且對於一些分子而言，此可引起不可溶性包涵體形成。諸如二硫蘇糖醇、及 β -巰基乙醇之還原劑及諸如胍-HCl 及尿素之變性劑可用於使蛋白質再溶解。替代方法為使蛋白質表現於細菌之周質空間 (periplasmic space) 中，該周質空間提供氧化性環境及類伴侶蛋白 (chaperonin-like) 及二硫化物異構酶且可引起可溶性蛋白質產生。前導序列典型地融合至待表現之蛋白質，從而將蛋白質引導至周質。接著在周質內部藉由信號肽酶移除前導序列。周質靶向性前導序列之實例包括來自果膠酸裂解酶基因之 pelB 前導序列及源自鹼性磷酸酶基因之前導序列。在一些狀況下，周質表現允許所表現之蛋白質滲漏至培養基中。蛋白質之分泌允許自培養物上清液快速及簡單純化。未經分泌之蛋白質可藉由滲透溶解而自周質獲得。類似於細胞質表現，在一些狀況下，蛋白質可變成不可溶的且可使用變性劑及還原劑來促進溶解及再摺疊。誘導及生長之溫度亦可影響表現量及溶解性，典型地使用介於 25°C 與 37°C 之間的溫度。細菌典型地產生

無糖基化 (aglycosylated) 之蛋白質。因此，若蛋白質出於功能之考慮需要糖基化，則可在自宿主細胞純化後試管內添加糖基化。

b. 酵母細胞

諸如釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、乳酸克魯維酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 及巴斯德畢赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的酵母為熟知之可用於產生諸如本文中所述之任何蛋白質之蛋白質的酵母表現宿主。酵母可用游離型複製載體或藉由經同源重組之穩定染色體整合來加以轉型。誘導性啟動子典型地用於調節基因表現。該等啟動子之實例包括 GAL1、GAL7 及 GAL5 及金屬硫蛋白啟動子，諸如 CUP1、AOX1 或其他畢赤酵母 (*Pichia*) 或其他酵母啟動子。表現載體常常包括用於選擇及維持經轉型 DNA 之諸如 LEU2、TRP1、HIS3 及 URA3 之可選擇標記。表現於酵母中之蛋白質常常為可溶解的。與諸如 Bip 之伴侶蛋白及蛋白質二硫化物異構酶共同表現可改良表現量及溶解性。另外，酵母中所表現之蛋白質可使用分泌信號肽融合 (諸如來自釀酒酵母之酵母交配型 α -因子分泌信號) 及與酵母細胞表面蛋白質 (諸如 Aga2p 交配型黏著受體或 *Arxula adenivorans* 葡萄糖澱粉酶) 之融合來引導分泌。諸如用於 Kex-2 蛋白酶之蛋白酶裂解位點可經工程改造以當所表現之多肽自分泌路徑排出時自該等多肽移除所融合之序列。酵母亦能夠在 Asn-X-Ser/Thr 基元處

糖基化。

c. 昆蟲細胞

尤其使用桿狀病毒表現之昆蟲細胞適用於表現諸如玻尿酸酶多肽之多肽。昆蟲細胞表現高含量之蛋白質且能夠產生由高等真核細胞所用之大多數轉譯後修飾。桿狀病毒具有限制性宿主範圍，其改良安全性且減少真核表現之調節性顧慮。典型表現載體使用用於高程度表現之啟動子，諸如桿狀病毒之多角體蛋白啟動子（polyhedrin promoter）。常用之桿狀病毒系統包括諸如苜蓿銀紋夜蛾核多角體病病毒（*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV）及家蠶（*Bombyx mori*）核多角體病病毒（BmNPV）之桿狀病毒及諸如源自草地黏蟲（*Spodoptera frugiperda*）之 Sf9、一星黏蟲（*Pseudaletia unipuncta*）（A7S）及黑脈金斑蝶（*Danaus plexippus*）（DpN1）之昆蟲細胞系。為高程度表現，待表現之分子之核苷酸序列直接與病毒之多角體蛋白起始密碼子之下游融合。哺乳動物分泌信號在昆蟲細胞中經精確加工且可用於使所表現之蛋白質分泌至培養基中。另外，細胞系一星黏蟲（A7S）及黑脈金斑蝶（DpN1）產生具有類似於哺乳動物細胞系統之糖基化模式之蛋白質。

在昆蟲細胞中之替代表現系統為經穩定轉型之細胞之使用。可使用諸如 Schneider 2（S2）及 Kc 細胞（黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*））及 C7 細胞（白紋伊蚊（*Aedes albopictus*））之細胞系用於表現。果蠅（*Drosophila*）金屬

硫蛋白啟動子可用於在具有鎘或銅之重金屬誘導存在下誘導高程度之表現。典型地藉由使用諸如新黴素 (neomycin) 及潮黴素 (hygromycin) 之可選擇標記來維持表現載體。

d. 哺乳動物細胞

哺乳動物表現系統可用於表現包括可溶性玻尿酸酶多肽之蛋白質。可藉由諸如腺病毒之病毒感染或藉由諸如脂質體、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖之直接 DNA 轉移及藉由諸如電穿孔及顯微注射之物理方法將表現構築體轉移至哺乳動物細胞。用於哺乳動物細胞之表現載體典型地包括 mRNA 加帽位點 (cap site)、TATA 盒、轉譯起始序列 (Kozak 一致序列) 及聚腺苷酸化元件。亦可添加 IRES 元件以允許與諸如可選擇標記之另一基因的雙順反子表現。該等載體常常包括用於高程度表現之轉錄啟動子-增強子，例如 SV40 啟動子-增強子、人類細胞巨大病毒 (CMV) 啟動子及勞氏肉瘤病毒 (RSV) 之長末端重複。此等啟動子-增強子在許多細胞類型中為活性的。亦可使用組織及細胞型啟動子及增強子區以用於表現。例示性啟動子/增強子區包括 (但不限於) 彼等來自諸如彈性蛋白酶 I、胰島素、免疫球蛋白、小鼠乳房腫瘤病毒、白蛋白、 α 胎蛋白、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶、 β 球蛋白、髓鞘鹼性蛋白、肌凝蛋白輕鏈 2 及促性腺釋放激素基因控制之基因的彼等啟動子/增強子區。可使用可選擇標記來選擇及維持具有表現構築體之細胞。可選擇標記基因之實例包括 (但不限於) 潮黴素 B 磷酸轉移酶、腺苷去胺酶、黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶、胺基糖苷磷酸轉

移酶、二氫葉酸還原酶 (DHFR) 及胸苷激酶。舉例而言，可在甲胺喋呤存在下進行表現以僅選擇表現 DHFR 基因之彼等細胞。與諸如 TCR- ζ 及 Fc ϵ RI- γ 之細胞表面信號分子之融合可引導呈活性狀態之蛋白質在細胞表面表現。

許多細胞系可用於哺乳動物表現，包括小鼠、大鼠、人類、猴、雞及倉鼠細胞。例示性細胞系包括 (但不限於) CHO、Balb/3T3、HeLa、MT2、小鼠 NS0 (非分泌性) 及其他骨髓瘤細胞系、融合瘤及雜交瘤 (heterohybridoma) 細胞系、淋巴細胞、纖維母細胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、293S、2B8 及 HKB 細胞。亦可使用適應於無血清培養基之細胞系，該無血清培養基有助於自細胞培養基純化所分泌之蛋白質。實例包括 CHO-S 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 目錄號 11619-012) 及無血清 EBNA-1 細胞系 (Pham 等人, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84:332-42.)。亦可使用適應於在經最佳化以供最大表現之特殊培養基中生長之細胞系。舉例而言，DG44 CHO 細胞適應於在不含化學上定義之動物產品之培養基中的懸浮培養物中生長。

e. 植物

轉殖基因植物細胞及植物可用於表現諸如本文中所述之任何蛋白質之蛋白質。典型地使用諸如微彈轟擊及 PEG 介導之向原生質體中之轉移的直接 DNA 轉移且使用土壤桿菌 (agrobacterium) 介導之轉型來將表現構築體轉移至植物中。表現載體可包括啟動子及增強子序列、轉錄終止元件及轉譯控制元件。表現載體及轉型技術通常在諸如芥菜

(*Arabidopsis*)及煙草之雙子葉植物宿主與諸如玉米及稻米之單子葉植物宿主之間劃分。用於表現之植物啟動子之實例包括花椰菜嵌紋病毒啟動子、胭脂鹼合成酶啟動子、雙磷酸核糖羧化酶啟動子及泛素及 UBQ3 啟動子。諸如潮黴素、磷酸甘露糖異構酶及新黴素磷酸轉移酶之可選擇標記常用於促進轉型細胞之選擇及維持。轉型植物細胞可以細胞、聚集體（愈傷組織）形式維持於培養物中或再生於全植物中。轉殖基因植物細胞亦可包括經工程改造以產生玻尿酸酶多肽之海藻。因為植物具有不同於哺乳動物細胞之糖基化模式，所以此可影響此等宿主中所產生之蛋白質之選擇。

3. 純化技術

用於自宿主細胞純化包括可溶性玻尿酸酶多肽或其他蛋白質之多肽的方法將視所選宿主細胞及表現系統而定。對於分泌性分子而言，一般在移除細胞後自培養基純化蛋白質。對於細胞內表現而言，可使細胞溶解且自提取物純化蛋白質。當使用諸如轉殖基因植物及動物之轉殖基因有機體用於表現時，組織或器官可用作起始物質以製成溶解細胞提取物。另外，轉殖基因動物製備可包括在奶或蛋中製備可收集之多肽，且必要時可提取蛋白質且使用此項技術中之標準方法進一步純化。

諸如可溶性玻尿酸酶多肽之蛋白質可使用此項技術中已知之標準蛋白質純化技術加以純化，該等技術包括（但不限於）SDS-PAGE、尺寸分級（size fraction）及尺寸排阻

層析、硫酸銨沈澱及諸如陰離子交換之離子交換層析。親和純化技術亦可用於改良製劑之效率及純度。舉例而言，與玻尿酸酶結合之抗體、受體及其他分子可用於親和純化中。表現構築體亦可經工程改造以將諸如 myc 抗原決定基、GST 融合體或 His₆ 之親和標籤添加至蛋白質中且分別用 myc 抗體、麩胱甘肽樹脂及 Ni-樹脂加以親和純化。可藉由此項技術中已知之任何方法來評定純度，包括凝膠電泳及染色及分光光度技術。

F. 免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶多肽之製備、調配及投藥

在本文中提供免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶之醫藥組合物以用於皮下投藥。例如 PH20 之可溶性玻尿酸酶之醫藥組合物的調配物在此項技術中為已知的（參見例如美國公開申請案第 US20040268425 號、第 US20050260186 號及第 US20060104968 號）。可溶性玻尿酸酶係與免疫球蛋白之醫藥調配物共同調配或共同投予以藉由增加免疫球蛋白之生物可用率來增強免疫球蛋白向身體中之所需部位之傳遞。舉例而言，IG 與玻尿酸酶之共同投予或共同調配可藉由在投予後更快速之滲透以使較多之 IG 到達血液及/或使較少之 IG 降解來改良吸收程度及/或吸收速率且因此改良劑之生物可用率。可例如藉由在投藥後施加與體積注射有關之流體靜力壓組合與玻尿酸降解有關之流動阻抗降低來加速間質流動及潛在結締組織輸送來達成增加之吸收及生物可用率。因此，與皮下投藥之習知方法相比，可溶性玻尿酸

酶可用於在皮下投藥後達成升高及/或更快速地達到之免疫球蛋白濃度以提供例如對於給定劑量之更有效及/或更快速反應。或者，可溶性玻尿酸酶可用於在所投予之 IG 劑量較低之情況下達成給定反應。可溶性玻尿酸酶在注射或輸注部位處或附近增強總體流體流動之能力亦可改良相關藥理傳遞之其他態樣。舉例而言，總體流體流動增加可有助於使得所注射體積之流體更易於自注射部位擴散（潛在降低注射之疼痛或其他不良後果）。此對於皮下輸注尤其重要，其允許投予更高劑量。除生物可用率增加以外，與習知靜脈內投藥途徑相比，IG 與可溶性玻尿酸酶之共同投予或共同調配提供更安全或更便利之投藥途徑。

因此，藉助於生物可用率增加，免疫球蛋白可以製備及投予當前靜脈內（IVIG）製劑之劑量及頻率來皮下投予。優於當前 IG 皮下調配物之優點在於共同投予或共同調配之玻尿酸酶/IG 可產生更有利之給藥攝生法（例如給藥頻率較小）。藉由較小之頻率或較低之劑量，可減少與毒性有關之副作用。一般而言，皮下 IG 治療之藥物動力學及/或藥效學得到改良。另外，IG 之皮下投藥亦具有優於當前靜脈內輸注之優點。舉例而言，皮下輸注允許由患者或家屬而非由熟練護士來輸注；可以較高速率達成輸注以使 IG 在 1-3 小時內輸注（相比習知 IVIG 治療之 5-10 小時 IG 輸注）；不存在對功能靜脈之要求；不存在輸注相關之副作用，諸如血栓形成、頭痛、血栓性靜脈炎及噁心及較小概率之不良事件；且輸注可在家中或任何地方進行。

組合物可調配成冷凍乾燥或液體形式。在組合物以冷凍乾燥形式提供之情況下，其可在臨用前藉由例如無菌鹽水溶液之合適緩衝液來復水。組合物可共同或分開提供。出於本文中之目的，典型地分開提供該等組合物。可溶性玻尿酸酶及 IG 可包裝成用於共同、連續或間斷投藥之分開的組合物。該等組合可包裝成套組。

1. 調配物

可將化合物調配成用於皮下投藥之任何合適醫藥製劑，諸如溶液、懸浮液、散劑或持續釋放調配物。典型地可使用此項技術中所熟知之技術及程序將化合物調配成醫藥組合物（參見例如 Ansel *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 第四版, 1985, 126）。鑒於管理機構或其他機構之批准，根據一般公認之藥典來製備用於動物及人類之醫藥學上可接受組合物。調配物應適合於投藥模式。

醫藥組合物可包括諸如稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑之載劑，其可與玻尿酸酶或 IG 一起投予。E. W. Martin 之「Remington's Pharmaceutical Sciences」中描述合適醫藥載劑之實例。該等組合物將含有一般呈純化形式或部分純化形式之治療有效量之化合物連同合適量之載劑以提供用於向患者適當投藥之形式。該等醫藥載劑可為無菌液體，諸如水及油，包括石油、動物油、植物油或合成起源之油，諸如花生油、大豆油、礦物油及芝麻油。當靜脈內投予醫藥組合物時，水為典型載劑。鹽水溶液及水性右旋糖及甘油溶液亦可用作尤其用於可注射溶液之液體載劑。組合物

可含有連同活性成份一起之下列物質：稀釋劑，諸如乳糖、蔗糖、磷酸二鈣或羧甲基纖維素；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸鈣及滑石；及黏合劑，諸如澱粉、天然樹膠（諸如阿拉伯膠（gum acaciagelatin））、葡萄糖、糖蜜、聚乙烯吡咯啉、纖維素及其衍生物、聚乙烯吡咯酮、交聯聚乙烯吡咯酮及熟習此項技術者所知之其他該等黏合劑。合適醫藥賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水及乙醇。必要時，組合物亦可含有較少量之濕潤劑或乳化劑或 pH 緩衝劑，例如乙酸酯、檸檬酸鈉、環糊精衍生物、單月桂酸脫水山梨糖醇酯、三乙醇胺、乙酸鈉、油酸三乙醇胺及其他該等試劑。

醫藥治療活性化合物及其衍生物典型地以單位劑型或多劑型調配及投予。每一單位劑量含有足以產生所需治療作用之預定量之治療活性化合物以及所需之醫藥載劑、媒劑或稀釋劑。單位劑型之實例包括安瓿及注射器及個別包裝之錠劑或膠囊。單位劑型可以其分數或倍數形式投予。多劑型為包裝於單個容器中之用於以分離之單位劑型投予的複數個相同單位劑型。多劑型之實例包括小瓶、錠劑或膠囊瓶或品脫或加侖瓶。因此，多劑型為未在包裝中分離之多個單位劑量。一般而言，可製備含有處於 0.005% 至 100% 範圍內之活性成份（其餘由無毒載劑組成）之劑型或組合物。

本文中所提供之組合物典型地經調配以用於藉由皮下途徑投予，但亦涵蓋其他投藥途徑，諸如熟習此項技術者已知之任何途徑，包括肌肉內、靜脈內、皮內、病變內、腹膜內注射、硬膜外、經鼻、經口、經陰道、經直腸、表皮、局部、經耳、吸入、頰內（例如舌下）及經皮投藥或任何途徑。適合於該等途徑之調配物為熟習此項技術者所知。投藥可視治療部位而為局部、表皮或全身性的。可例如（但不限於）藉由手術期間之局部輸注、表皮塗覆（例如手術後連同傷口塗劑一起）、藉由注射、藉助於導管、藉助於栓劑或藉助於植入物來達成對需要治療之區域之局部投藥。組合物亦可與其他生物活性劑一起連續、間斷或在同一組合物中投予。投藥亦可包括控制釋放系統，其包括控制釋放調配物及控制釋放之裝置（諸如藉助於泵）。

在任何給定狀況下，最合適之途徑視多種因素而定，諸如疾病性質、疾病進程、疾病嚴重度、所使用之特定組合物。出於本文中之目的，需要投予玻尿酸酶以使其到達皮膚或組織之間質，從而降解間質空間以供免疫球蛋白之後繼傳遞。因此，涵蓋諸如藉由皮下投藥方法在皮膚下直接投藥。因此，在一實例中，局部投藥可藉由用諸如注射器或含有諸如針之注射裝置之其他製品注射來達成。在另一實例中，局部投藥可藉由輸注來達成，輸注可藉由使用泵或其他類似裝置而變得容易。亦涵蓋其他投藥模式。醫藥組合物可調配成適用於每一投藥途徑之劑型。

本文中涵蓋一般以注射或輸注為特徵之皮下投藥。可

注射劑可以習知形式製備，該等習知形式為液體溶液或懸浮液、適於在注射前於液體中形成溶液或懸浮液之固體形式或乳液。合適賦形劑為例如水、鹽水、右旋糖、甘油或乙醇。醫藥組合物可含有其他較小量之無毒輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、pH 緩衝劑、穩定劑、溶解增強劑及其他該等試劑，諸如乙酸鈉、單月桂酸脫水山梨糖醇酯、油酸三乙醇胺及環糊精。本文中亦涵蓋緩慢釋放或持續釋放系統之植入以便維持恆定劑量含量（參見例如美國專利第 3,710,795 號）。該等組合物中所含有之活性化合物之百分比極其視其特定性質以及化合物活性及個體需要而定。

可注射劑經設計以用於局部及全身性投藥。出於本文中之目的，局部投藥需要直接投予至受影響之間質。用於非經腸投藥之製劑包括準備用於注射之無菌溶液、準備在臨用前與溶劑組合之諸如冷凍乾燥粉末之無菌乾燥可溶性產品（包括皮下錠劑）、準備用於注射之無菌懸浮液、準備在臨用前與媒劑組合之無菌乾燥不可溶性產品及無菌乳液。溶液可為水性或非水性的。若靜脈內投藥，則合適載劑包括生理鹽水或磷酸鹽緩衝鹽水（PBS），及含有諸如葡萄糖、聚乙二醇、及聚丙二醇、及其混合物之增稠劑、及增溶劑的溶液。

用於非經腸製劑中之醫藥學上可接受之載劑包括水性媒劑、非水性媒劑、抗微生物劑、等張劑、緩衝劑、抗氧化劑、局部麻醉劑、懸浮及分散劑、乳化劑、鉗合或螯合劑及其他醫藥學上可接受之物質。

水性媒劑之實例包括氯化鈉注射液、任氏注射液 (Ringers Injection)、等張右旋糖注射液、無菌水注射液、右旋糖及乳酸任氏注射液。非水性非經腸媒劑包括植物源性不揮發性油、棉籽油、玉米油、芝麻油及花生油。可將抗微生物劑以抑菌或抑真菌濃度添加至包裝於多劑量容器中之非經腸製劑中，該等抗微生物劑包括酚或甲酚、汞劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯、硫柳汞、羥基氯苯胺 (benzalkonium chloride) 及苜索氯銨 (benzethonium chloride)。等張劑包括氯化鈉及右旋糖。緩衝劑包括磷酸鹽及檸檬酸鹽。抗氧化劑包括硫酸氫鈉。局部麻醉劑包括鹽酸奴佛卡因 (procaine hydrochloride)。懸浮及分散劑包括羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素及聚乙烯吡咯啉酮。乳化劑包括聚山梨醇酯 80 (吐溫 (TWEEN) 80)。金屬離子之鉗合或螯合劑包括 EDTA。醫藥載劑亦包括用於水可混溶媒劑之乙醇、聚乙二醇、及丙二醇、及用於 pH 調節之氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。

調節醫藥活性化合物之濃度使得注射提供產生所需藥理作用之有效量。如此項技術中所知，確切劑量視患者或動物年齡、重量及情況而定。單位劑量之非經腸製劑可包裝於安瓿、小瓶或具有針之注射器中。含有醫藥活性化合物之液體溶液或復水粉末製劑之體積隨待治療之疾病及選擇用於包裝之特定製品而變。如此項技術中所知及所實踐，用於非經腸投藥之所有制劑必須為無菌的。

在一實例中，醫藥製劑可呈液體形式，例如溶液、糖

漿或懸浮液。若以液體形式提供，則醫藥製劑可以濃縮製劑形式提供以在使用前稀釋至治療有效濃度。該等液體製劑可藉由習知方法用醫藥學上可接受之添加劑來製備，該等添加劑為諸如懸浮劑（例如山梨糖醇糖漿、纖維素衍生物或氫化食用脂肪）；乳化劑（例如卵磷脂或阿拉伯膠）；非水性媒劑（例如杏仁油、油性酯或經分餾之植物油）；及防腐劑（例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸）。在另一實例中，醫藥製劑可以冷凍乾燥形式呈現以在使用前用水或其他合適媒劑復水。

投藥方法可經使用以降低所選化合物對降解過程（諸如蛋白質水解降解及經由抗原性及免疫原性反應之免疫干預）之暴露。該等方法之實例包括在治療部位局部投藥。已報導使治療劑聚乙二醇化以增加對蛋白質水解之抵抗性、增加血漿半衰期及降低抗原性及免疫原性。聚乙二醇化方法之實例在此項技術中為已知的（參見例如 Lu 及 Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu 及 Felix, *Peptide Res.*, 6: 142-6, 1993; Felix 等人, *Int. J. Peptide Res.*, 46 : 253-64, 1995; Benhar 等人, *J. Biol. Chem.*, 269: 13398-404, 1994; Brumeanu 等人, *J Immunol.*, 154: 3088-95, 1995; 亦參見 Caliceti 等人 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 及 Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S)。聚乙二醇化亦可用於活體內核酸分子傳遞。舉例而言，使腺病毒聚乙二醇化可增加穩定性及基因轉移（參見例如 Cheng 等人 (2003) *Pharm. Res.* 20(9):

1444-51)。

冷凍乾燥粉末

在本文中關注冷凍乾燥粉末，其可經復水而以溶液、乳液及其他混合物形式投予。其亦可以固體或凝膠形式復水及調配。

無菌冷凍乾燥粉末係藉由將活性化合物溶解於緩衝溶液中來製備。緩衝溶液可含有改良穩定性之賦形劑或粉末或自粉末製備之復水溶液之其他藥理組份。後續無菌過濾溶液，繼而在熟習此項技術者已知之標準條件下冷凍乾燥以提供所需調配物。簡而言之，冷凍乾燥粉末係藉由將諸如右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合適試劑之賦形劑溶解於諸如檸檬酸鹽、磷酸鈉或磷酸鉀或熟習此項技術者已知之其他該等緩衝液之合適緩衝液中來製備。接著，將所選之酶添加至所得混合物中，且攪拌直至其溶解。所得混合物經無菌過濾或處理以移除微粒且確保無菌，且將其分配至小瓶中以供冷凍乾燥。每一小瓶容納單個劑量或多個劑量之化合物。冷凍乾燥粉末可在諸如約 4°C 至室溫之合適條件下儲存。用緩衝溶液使此冷凍乾燥粉末復水以提供用於非經腸投藥之調配物。

2. 劑量及投藥

本文中所提供之可溶性玻尿酸酶可調配成典型地用於單一劑量投藥之醫藥組合物。以足以在不存在對所治療患者之不合需要之副作用的情況下發揮治療有效作用之量包

括所選之可溶性玻尿酸酶。治療有效濃度可藉由諸如使用本文中所提供或此項技術中已知之檢定在已知試管內及活體內系統中測試多肽來根據經驗判定（參見例如 Taliani 等人 (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67；Filocamo 等人 (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427；Sudo 等人 (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18；Buffard 等人 (1995) *Virology*, 209:52-59；Bianchi 等人 (1996) *Anal. Biochem.*, 237: 239-244；Hamatake 等人 (1996) *Intervirology* 39:249-258；Steinkuhler 等人 (1998) *Biochem.*, 37:8899-8905；D'Souza 等人 (1995) *J Gen. Virol.*, 76:1729-1736；Takeshita 等人 (1997) *Anal. Biochem.*, 247:242-246；亦參見例如 Shimizu 等人 (1994) *J. Virol.* 68:8406-8408；Mizutani 等人 (1996) *J. Virol.* 70:7219-7223；Mizutani 等人 (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:822-826；Lu 等人 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 93:1412-1417；Hahm 等人, (1996) *Virology*, 226:318-326；Ito 等人 (1996) *J. Gen. Virol.*, 77:1043-1054；Mizutani 等人 (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212:906-911；Cho 等人 (1997) *J. Virol. Meth.* 65:201-207) 且接著自其推斷用於人類之劑量。

治療有效劑量典型地等於或約為 500 單位至 100,000 單位之可溶性玻尿酸酶。舉例而言，可溶性玻尿酸酶可以等於或約為 500 單位、1000 單位、2000 單位、5000 單位、10,000 單位、30,000 單位、40,000 單位、50,000 單位、60,000 單位、70,000 單位、80,000 單位、90,000 單位、100,000 單位

或 100,000 單位以上皮下投予。在一些實例中，劑量可以與所投予之 IG 之比率形式提供。舉例而言，玻尿酸酶可以每公克 IG 10 U 至 500 U 或 500 U 以上來投予，例如等於或約為 10 U/g、20 U/g、30 U/g、40 U/g、50 U/g、60 U/g、70 U/g、80 U/g、90 U/g、100 U/g、150 U/g、200 U/g、300 U/g、400 U/g、500 U/g 或 500 U/g 以上。本文中所涵蓋之玻尿酸酶之注射或輸注體積典型地等於或約為 0.5 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml、7 ml、8 ml、9 ml、10 ml、15 ml、20 ml、30 ml、40 ml、50 ml 或 50 ml 以上。玻尿酸酶可以等於或約為 50 U/ml、100 U/ml、150 U/ml、200 U/ml、400 U/ml 或 500 U/ml 之儲備溶液形式提供或可以例如等於或約為 1000 U/ml、1500 U/ml、2000 U/ml、4000 U/ml 或 5000 U/ml 之更濃縮形式提供以供直接使用或用於在使用前稀釋至有效濃度。可溶性玻尿酸酶可以液體或冷凍乾燥調配物形式提供。冷凍乾燥調配物對於儲存大單位劑量之可溶性玻尿酸酶而言為理想的。

本文中所提供之免疫球蛋白製劑可以用於單一或多劑量使用之醫藥組合物形式調配。免疫球蛋白製劑典型地係以足以提供每月一次劑量之量調配以用於單一劑量投藥，但免疫球蛋白製劑可以用於多劑量投藥之較少量提供。如本文中別處所述，IG 製劑可以冷凍乾燥或液體形式提供。

以治療有效劑量提供免疫球蛋白。治療有效濃度可藉由在諸如本文中所提供之檢定的已知試管內及活體內系統中測試化合物來根據經驗判定。組合物中所選之免疫球蛋

白之濃度視複合物之吸收、鈍化及排泄率、複合物之物理化學特徵、給藥時程及所投予之量以及熟習此項技術者已知之其他因素而定。舉例而言，應瞭解，精確劑量及治療持續時間隨所治療之組織而變且可使用已知測試方案或藉由自活體內或試管內測試資料推斷來根據經驗判定。應注意，濃度及劑量值亦可隨所治療之個體年齡而變。應進一步瞭解，對於任何特定個體而言，特定劑量攝生法應隨時間推移而根據個體需要及投藥或指導調配物投藥之人員之專業判斷來調整，且應瞭解本文中所闡明之濃度範圍僅為例示性的且不意欲限制其範疇。經投予用於治療疾病或病狀（例如 IG 可治療性疾病或病狀）之所選免疫球蛋白製劑之量可藉由標準臨床技術來判定。另外，可使用試管內檢定及動物模型來幫助識別最佳劑量範圍。

因此，可根據經驗判定之精確劑量可視特定免疫球蛋白製劑、可溶性玻尿酸酶之攝生法及給藥時程、投藥途徑、待治療之疾病類型及疾病之嚴重度而定。對於所治療之特定適應症而言，一般以允許以等於每月一次 IV 劑量之劑量皮下投藥之量提供 IG。特定之每月一次 IV 劑量隨待治療之疾病而變，且因此可不同。皮下投予 IG 之例示性劑量範圍等於或約為 1 公克 (g)、5 g、10 g、20 g、30 g、40 g、50 g、60 g、70 g、80 g、90 g、100 g 或 200 g。其特定劑量及調配物視適應症及個體而定。舉例而言，可以每公斤體重 (BW) 50 毫克 (50 mg/kg BW)、100 mg/kg BW、200 mg/kg BW、300 mg/kg BW、400 mg/kg BW、500 mg/kg BW、600

mg/kg BW 或 600 mg/kg BW 以上投予劑量。必要時，劑量可根據經驗來判定。為達成該等劑量，皮下投予之 IG 製劑之體積可等於或約為 50 ml、100 ml、200 ml、300 ml、400 ml、500 ml、600 ml、700 ml 或 700 ml 以上。舉例而言，用於本文中所述之適應症的 10% 液體 IG 調配物（100 mg/ml）可以 50 ml 至 700 ml 之體積投予以達成 0.5 g 至 70 g IG 之劑量。

在投予大體積之情況下，典型地藉由輸注來投藥。可以等於或約為 0.5 ml/kg/BW/h、1 ml/kg/BW/h、2 ml/kg/BW/h、3 ml/kg/BW/h、4 ml/kg/BW/h 或 5 ml/kg/BW/h 之輸注速率對個體進行給藥。輸注速率可根據經驗判定且典型地隨個體之可耐受性而變。若在輸注期間出現不良反應，則可將輸注速率減慢至恰好低於出現不良事件之速率。若回應於速率降低而使不良事件消除，則可在醫師斟酌下緩慢增加輸注速率。可藉由重力、泵輸注或完全 20 公克-30 公克劑量之注射來促進皮下 IG 輸注。對於輸注而言，一般可使用靜脈內輸注泵。IG 可以等於或約為 5 ml/h、10 ml/h、30 ml/h、60 ml/h、120 ml/h、240 ml/h 或 300 ml/h 之速率來輸注。只要輸注可為患者所耐受即可在治療過程期間增加輸注速率。輸注之投藥時間一般等於或約為 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、4 h 或 4 h 以上。歸因於藉由皮下投予與玻尿酸酶共同調配及/或共同投予之 IG 所達成之高輸注速率，所以輸注時間顯著小於習知 IVIG 治療之輸注時間。在輸注時間超過所需限度之情況下，可在醫

師及個體之斟酌下開始使用第二輸注部位。典型地開始使用距初始部位至少 10 cm 之第二部位。

用於輸注之技術為熟習此項技術者所知，且在治療醫師之技術範圍內。合適劑量之 IG 一般可儲集於標準 IV 袋中。舉例而言，可使用不通氣輸注裝置，其在末端附近具有 Y 形口。可將 24 號皮下輸注針在個體所偏好之部位處插入，但由於待輸注之溶液體積，所以推薦腹部且其次大腿。玻尿酸酶及 IG 可提供於相同 Y 形口設備中。出於藉由重力或泵來輸注之目的，在本文中亦可使用其他製品且其包括（但不限於）管、瓶、注射器或其他容器。

可溶性玻尿酸酶可在 IG 製劑之後、與之間歇或同時投予。一般在投予 IG 製劑之前投予玻尿酸酶以允許玻尿酸酶降解間質空間中之玻尿酸。舉例而言，可在投予 IG 製劑前第 1 分鐘、2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、6 分鐘、7 分鐘、8 分鐘、9 分鐘、10 分鐘、20 分鐘或 30 分鐘投予可溶性玻尿酸酶。在一些實例中，玻尿酸酶與免疫球蛋白製劑一起投予。如將由熟習此項技術者所瞭解，所需之共同投予接近度在顯著程度上視劑在特定組織環境中之作用半衰期及所治療之特定疾病而定，且可藉由在合適模型（諸如合適動物模型）中測試以不同時間投予劑之作用來容易地最佳化。在一些情境下，投予玻尿酸酶之最佳時間應超過 60 分鐘。

在輸注 IG 之前，一般以等於或約為 0.2 ml/min、0.5 ml/min、1 ml/min、2 ml/min、5 ml/min、10 ml/min 或 10

ml/min 以上之速率注射可溶性玻尿酸酶。舉例而言，可經由用於後繼輸注 IG 之相同 Y 形口來注射可溶性玻尿酸酶。如上文所述，所投予之可溶性玻尿酸酶之體積隨所需劑量而變，但可視可用之可溶性玻尿酸酶儲備調配物之濃度而變化。舉例而言，在本文中預期不以大於約 50 ml 之體積來投予可溶性玻尿酸酶，且典型地以 5 ml-30 ml 之體積來投予。在醫師之斟酌下，對於較大體積可使用注射泵。

在不耐受輸注（例如，其引起中度至重度局部反應）之情況下，可開始使用第二輸注部位以便個體接受完全劑量。

IG 製劑可一次投予或可分為多個較小劑量以按時間間隔投予。可以一或多個劑量經治療時程（例如經若干小時、天、週或月）投予所選 IG 製劑。在一些狀況下，連續投藥為適用的。應瞭解，投藥之精確劑量及過程視適應症及患者可耐受性而定。

同樣，應瞭解精確劑量及治療持續時間隨所治療之疾病而變且可使用已知測試方案或藉由自活體內或試管內測試資料推斷來根據經驗判定。應注意，濃度及劑量值亦可隨待緩解之病狀之嚴重度而變。應進一步瞭解，對於任何特定個體而言，特定劑量攝生法應隨時間推移而根據個體需要及投藥或指導組合物投藥之人員之專業判斷來調整，且應瞭解本文中所闡明之濃度範圍僅為例示性的且不意欲限制含有其之組合物及組合之範疇或使用。可每小時、每天、每週、每月、每年或一次性投予組合物。劑量攝生法

一般經選擇以限制毒性。應注意，歸因於毒性或骨髓、肝或腎或其他組織功能障礙，主治醫師應瞭解如何及何時終止、中斷或調整治療至較低劑量。相反，若臨床反應不足（排除毒性副作用），則主治醫師亦應瞭解如何及何時將治療調整至較高含量。

G. 評定活性、生物可用率及藥物動力學之方法

檢定可用於評定免疫球蛋白單獨或與可溶性玻尿酸酶組合之試管內及活體內活性。在該等檢定中包括彼等評定皮下投予之免疫球蛋白之藥物動力學特性（包括生物可用率及可耐受性）的檢定。亦可使用此項技術中熟知之檢定來評定免疫球蛋白及玻尿酸酶之生物活性。可使用該等檢定（例如）來判定用於治療之免疫球蛋白及玻尿酸酶之合適劑量及給藥頻率。

1. 藥物動力學及可耐受性

藥物動力學及可耐受性研究（諸如下文描述於實施例 1 中之彼等研究）可使用動物模型來進行或可在對患者進行臨床研究期間進行。動物模型包括（但不限於）小鼠、大鼠、家兔、犬、豚鼠及非人類之靈長類動物模型（諸如獼猴或恆河猴（*rhesus macaques*））。在一些情況下，使用健康動物進行藥物動力學及可耐受性研究。在其他實例中，使用具有考慮用免疫球蛋白治療之疾病之動物模型（諸如具有下文所述之疾病及病狀中之任一者的動物模型）來進行研究。

投藥後，可藉由量測下列參數來評定皮下投予之免疫

球蛋白之藥物動力學：最大（峰值）血漿免疫球蛋白濃度（ C_{max} ）、峰值時間（亦即出現最大血漿免疫球蛋白濃度之時間； T_{max} ）、最小血漿免疫球蛋白濃度（亦即免疫球蛋白劑量之間的最小血漿濃度； C_{min} ）、消除半衰期（ $T_{1/2}$ ）及曲線下面積（亦即由繪製血漿免疫球蛋白濃度隨時間之關係圖所產生之曲線下的面積；AUC）。藉由比較皮下傳遞後免疫球蛋白之曲線下面積（ AUC_{sc} ）與靜脈內傳遞後免疫球蛋白之AUC（ AUC_{iv} ）來測定皮下投予之免疫球蛋白之絕對生物可用率。可使用公式： $F = ([AUC]_{sc} \times \text{劑量}_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times \text{劑量}_{iv})$ 來計算絕對生物可用率（F）。可使用此項技術中已知之任何適於評定血液樣品中之免疫球蛋白濃度之方法來量測皮下投藥後免疫球蛋白於血漿中之濃度。例示性方法包括（但不限於）ELISA及濁度測定法。

在藥物動力學研究中可投予給藥之劑量範圍及不同給藥頻率來評定增加或減少劑量中之免疫球蛋白及/或玻尿酸酶濃度之效應。亦可在共同投予或未共同投予玻尿酸酶之情況下評定皮下投予之免疫球蛋白之藥物動力學特性（諸如生物可用率）。舉例而言，可向犬（諸如米格魯犬（beagle））皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白或單獨皮下投予免疫球蛋白。亦向另一組米格魯犬給予免疫球蛋白之靜脈內劑量。接著可在各個時間點獲取血液樣品且諸如藉由濁度測定法來測定血漿中之免疫球蛋白量。接著可量測AUC且可測定在投予或未投予玻尿酸酶之情況下皮下投予之免疫球蛋白之生物可用率。可進行該等研究來評定與玻尿酸酶

共同投予對皮下投予之免疫球蛋白之藥物動力學特性（諸如生物可用率）的影響。

評定安全性及可耐受性之研究在此項技術中亦為已知的且可在本文中使用的。在共同投予或未共同投予玻尿酸酶之情況下，皮下投予免疫球蛋白後，可監視任何不良反應之出現。不良反應可包括（但不限於）諸如浮腫或腫脹之注射部位反應、頭痛、發燒、疲勞、寒冷、面部潮紅、眩暈、蕁麻疹、喘鳴或胸悶、噁心、嘔吐、寒戰、背痛、胸痛、肌肉痙攣、癲癇發作或抽搐、血壓變化及過敏性或嚴重超敏性反應。典型地在安全性及可耐受性研究中投予多種劑量及不同給藥頻率來評定增加或降低劑量中之免疫球蛋白及/或玻尿酸酶濃度之效應。

2. 生物活性

a. 免疫球蛋白

可試管內或活體內評定免疫球蛋白用作治療劑之能力。舉例而言，可進行試管內檢定來評定免疫球蛋白中和病毒或細菌感染性之能力（Hiemstra 等人，(1994) J Lab Clin Med 123:241-6）。可使用其他試管內檢定來評定免疫球蛋白之其他生物活性。舉例而言，可使用此項技術中已知之包括（但不限於）ELISA、西方墨點法（Western blot）、北方墨點法（Northern blot）及流式細胞法之任何方法來評定標記表現以評定免疫球蛋白製劑與補體活化產物相互作用及調節補體活化產物、結合個體遺傳型抗體、結合巨噬細胞上之 Fc 受體及抑制包括細胞因子、趨化因子及金屬蛋白酶

之各種發炎性介體的能力。舉例而言，可使用流式細胞法來評定免疫球蛋白對外周血單核細胞上之趨化因子受體表現之影響 (Trebst 等人, (2006) *Eur J Neurology*)。在另一實例中，可使用北方墨點分析來評定免疫球蛋白對巨噬細胞上之金屬蛋白酶表現之影響 (Shapiro 等人, (2002) *Cancer* 95:2032-2037)。

亦可進行使用動物模型之活體內研究來評定免疫球蛋白之治療活性。可向感染一或多種微生物之動物模型投予免疫球蛋白且可諸如藉由量測微生物數目或量測重量作為發病標記來評定對感染進程之影響。亦可使用具有考慮使用免疫球蛋白治療之疾病及病狀之動物模型來評定免疫球蛋白之治療作用。該等動物模型在此項技術中為已知的，且包括 (但不限於) 下列疾病之小動物模型：X-連結無 γ 球蛋白血症 (XLA)、SCID、維斯科特-奧爾德裏奇症候群、川崎氏病、格巴二氏症候群、ITP、多發性肌炎、蘭伯特-伊頓肌無力症候群、重症肌無力及莫氏-沃特曼症候群 (Czitrom 等人 (1985) *J Immunol* 134:2276-2280; Ellmeier 等人, (2000) *J Exp Med.* 192: 1611-1624; Ohno (2006) *Drug Discovery Today: Disease Models* 3:83-89; Oyaizu 等人 (1988) *J Exp Med* 2017-2022; Hansen 等人, (2002) *Blood* 100:2087-2093; Strongwater 等人, (1984) *Arthritis Rheum.* 27:433-42; Kim 等人 (1998) *Annals NY Acad Sci* 841:670-676; Christadoss 等人 (2000) 94:75-87; Sommer 等人, (2005) *Lancet* 365:1406-1411; 美國專利第 7309810

號)。

b. 玻尿酸酶

可使用此項技術中熟知之方法來評定玻尿酸酶活性。在一實例中，使用微濁度檢定來量測活性。此係基於當玻尿酸與血清白蛋白結合時不溶性沈澱物之形成。藉由將玻尿酸酶與玻尿酸鈉（玻尿酸）一起培育設定時段（例如 10 分鐘）且接著藉由添加酸化之血清白蛋白來使未消化之玻尿酸鈉沈澱來量測活性。在額外發展時段後，於 640 nm 處量測所得樣品之濁度。由玻尿酸酶對玻尿酸鈉受質之活性所引起之濁度降低為玻尿酸酶酶促活性之量度。在另一實例中，使用微量滴定檢定來量測玻尿酸酶活性，其中在與玻尿酸酶培育後量測剩餘之生物素標記玻尿酸（參見例如 Frost 及 Stern (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269；美國專利公開案第 20050260186 號）。玻尿酸之葡萄糖醛酸殘基上之自由羧基經生物素標記，且生物素標記之玻尿酸受質與微量滴定板共價偶合。在與玻尿酸酶一起培育後，使用抗生物素蛋白-過氧化酶反應來偵測剩餘之生物素標記之玻尿酸受質，且將其與在與具有已知活性之玻尿酸酶標準物反應後所獲得之結果比較。其他用於量測玻尿酸酶活性之檢定在此項技術中亦為已知的且可用於本文中之方法中（例如參見 Delpech 等人, (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41；Takahashi 等人, (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263）。

亦可評定玻尿酸酶充當展布劑或擴散劑之能力。舉例而言，可在玻尿酸酶存在或不存在之情況下將台盼藍染料

皮下注射至裸小鼠之每一側上之側面皮膚中。接著諸如用測微計量測染色面積來測定玻尿酸酶充當展布劑之能力（美國專利第 20060104968 號）。

H. 治療用途

可使用本文中所述之方法來治療針對其使用免疫球蛋白之任何病狀。可皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白（IG）來治療可由免疫球蛋白治療來改善之任何病狀。本節提供 IG 之例示性治療用途。下文所述之治療用途為例示性的且不限制本文中所述方法之應用。治療用途包括（但不限於）用於各種免疫學、血液學、神經學、發炎性、皮膚病學及/或傳染性疾病及病狀之免疫球蛋白替代治療及免疫調節治療。在一些實例中，諸如在可能暴露於傳染性疾病（例如，意外針刺損傷）後，投予免疫球蛋白以強化健康患者之免疫反應。識別該等疾病或病狀係在治療醫師之技術範圍內。

與其他用於治療此等疾病及病狀之劑組合之免疫球蛋白可與玻尿酸酶皮下共同投予。舉例而言，其他可投予之劑包括（但不限於）抗生素、化學治療劑、類固醇消炎藥、非類固醇消炎藥及其他諸如細胞因子、趨化因子及生長因子之免疫調節劑。

必要時，可根據經驗判定或推斷特定劑量及持續時間及治療方案。舉例而言，可將靜脈內投予之免疫球蛋白之例示性劑量用作起點來判定合適劑量。劑量含量可基於多種因素加以判定，諸如個體體重、一般健康、年齡、所用

之特定化合物之活性、性別、膳食、投藥時間、排泄率、藥物組合、疾病之嚴重度及過程及患者對疾病之傾向及治療醫師之判斷。免疫球蛋白之劑量一般等於或約為每公斤體重 100 mg (亦即 100 mg/kg BW) 至 2 g/kg BW，且玻尿酸酶之劑量等於或約為每公克免疫球蛋白 10 U 至 500 U 或 500 U 以上，例如等於或約為 10 U/g、20 U/g、30 U/g、40 U/g、50 U/g、60 U/g、70 U/g、80 U/g、90 U/g、100 U/g、150 U/g、200 U/g、300 U/g、400 U/g、500 U/g 或 500 U/g 以上。應瞭解，所投予之量應隨所治療之適應症而變且可能隨將要耐受之副作用而變。可使用用於每一病症之公認模型來根據經驗判定劑量。

在改善患者病狀後，必要時，可與玻尿酸酶以組合方式皮下投予維持劑量之免疫球蛋白，且可修改劑量、劑型或投藥頻率或其組合。在一些狀況下，在任何疾病症狀復發後，個體可能需要基於長期之間歇治療。

1. 具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏症

免疫球蛋白可用於治療具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏症。原發性免疫缺乏症涵蓋特徵在於缺乏免疫系統之一或多種蛋白質之許多病症。原發性免疫缺乏症典型地為遺傳病症，且許多表現為保護性抗體產生障礙。因此，可向呈現該等疾病之患者投予免疫球蛋白作為免疫球蛋白替代治療。例示性原發性免疫缺乏症包括 (但不限於) 常見變異性免疫缺乏症 (CVID)、先天性無 γ 球蛋白血症、維斯科特-奧爾德裏奇症候群、嚴重複合型免疫缺乏症 (SCID)、

原發性低 γ 球蛋白血症、具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏疾病、X-連結無 γ 球蛋白血症 (XLA)、嬰兒期低 γ 球蛋白血症、及無抗體之副腫瘤性小腦變性。可向患有具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏症之患者以類似於免疫球蛋白靜脈內投藥所用之劑量的劑量皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白。例示性劑量包括例如 100 mg/kg BW 與 800 mg/kg BW 免疫球蛋白之間的劑量 (以四週之間隔時間)。視臨床反應而定，可增加或降低劑量，亦可增加或降低給藥頻率。

2. 血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症

具有血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症之患者歸因於該後天低 γ 球蛋白血症而易患上細菌感染，該等血液惡性腫瘤為諸如慢性淋巴細胞性白血病 (CLL)、多發性骨髓瘤 (MM)、非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 及其他相關惡性腫瘤及造血幹細胞後移植。低 γ 球蛋白血症由血液中缺乏 B-淋巴細胞及所造成之抗體含量較低引起且可見於具有 CLL、MM、NHL 之患者中且為白血病相關之免疫功能障礙及治療相關之免疫抑制的結果。體液性免疫缺乏主要為造成 (尤其) 受被膜包裹之微生物感染相關之發病風險及此等患者死亡率增加之原因。舉例而言，肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 以及退伍軍人桿菌 (*Legionella*) 及奴卡菌 (*Nocardia*) 屬為在具有 CLL 之患者中引起肺炎之常見細菌性病原體。亦已觀察到諸如肺炎肺囊蟲 (*Pneumocystis carinii*)、真菌、病毒

及分枝桿菌 (mycobacteria) 之機會性感染。可藉由投予免疫球蛋白來顯著降低此等患者中之感染數及嚴重度 (Griffiths 等人, (1989) Blood 73:366-368; Chapel 等人 (1994) Lancet 343:1059-1063)。因此, 可使用本文中所述之方法向該等患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白來防止復發感染。例示性劑量包括向具有血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症之患者靜脈內投予免疫球蛋白所用之彼等劑量。舉例而言, 可每 3 至 4 週皮下投予與玻尿酸酶組合之約 400 mg/kg BW 免疫球蛋白。在另一實例中, 在患者血清 IgG 小於 4 g/L 之治療第一個月可投予 400 mg/kg BW 之額外劑量。適當時, 可增加或降低所投予之免疫球蛋白量及給藥頻率。

3. 川崎氏病

川崎氏病為常常累及冠狀動脈之兒童及小嬰兒之急性發熱性多系統疾病。其亦稱作淋巴結症候群、黏膜皮膚淋巴結疾病、嬰兒多動脈炎及川崎氏症候群且為瞭解較少之影響包括皮膚及黏膜、淋巴結、血管壁及心臟之多個器官的自限性脈管炎 (self-limited vasculitis)。在恢復階段期間, 冠狀動脈動脈瘤自疾病之第二週開始出現。儘管病狀之起因為未知的, 但存在證據說明特徵性脈管炎由免疫反應引起, 該免疫反應特徵在於 T 細胞及巨噬細胞針對未知抗原活化、細胞因子分泌、多株 B 細胞機能亢進及針對內皮細胞及平滑肌細胞之自體抗體形成。在遺傳易感性個體中, 一或多種可能具有超抗原活性之不典型之常見感染因

子可觸發該疾病。在川崎氏病早期投予免疫球蛋白可預防冠狀動脈病變。向具有與川崎氏病有關之進行性炎症之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白可改善症狀。例示性劑量包括向具有川崎氏病之患者靜脈內投予免疫球蛋白所用之彼等劑量。舉例而言，可向具有川崎氏病之患者投予每公斤患者體重約 1 g-2 g 免疫球蛋白。舉例而言，此劑量可以 4 份 400 mg/kg BW 之劑量分連續 4 日投予。在另一實例中，可經 10 小時之時段以單一劑量形式投予 1 g/kg BW 之免疫球蛋白。適當時，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

4. 慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病

慢性發炎性髓鞘脫失多發性神經病 (CIDP) 為特徵在於腿及手臂進行性無力及感覺功能受損之神經病症。有時稱作慢性復發性多發性神經病之該病症係由周邊神經之髓鞘遭損壞而引起。儘管其可發生於任何年齡及兩種性別，但 CIDP 更常見於年輕成人中且男性多於女性。其常常以包括發麻或麻痺 (開始於腳趾及手指)、手臂及腿無力、深部腱反射喪失 (反射消失)、疲勞及感覺異常之症狀呈現。CIDP 與格巴二氏症候群密切相關且被視作彼急性病之慢性對應疾病。不存在特異性診斷性測試，但特徵性臨床及實驗室研究結果有助於將此病症與其他免疫介導性神經病症候群相辨別。研究指示用免疫球蛋白治療會減輕症狀 (van Schaik 等人, (2002) *Lancet Neurol.* 1:497-498)。因此，可使用本文中所述之方法向呈現 CIDP 之患者皮下共同投予玻尿

酸酶及免疫球蛋白。例示性劑量包括向具有 CIDP 之患者靜脈內投予免疫球蛋白所用之彼等劑量。在一實例中，向具有 CIDP 之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之約 2 g/kg BW 之免疫球蛋白。舉例而言，此劑量可以 5 份 400 mg/kg BW 之劑量分連續五日投予。適當時，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

5. 格巴二氏症候群

格巴二氏症候群為涉及周邊神經之發炎性髓鞘脫失之神經自體免疫病症。第一症狀包括不同程度之腿部無力或發麻感，其可波及手臂及上身。此等症狀之強度可增加直至肌肉完全不能使用且患者幾乎完全癱瘓，引起危及生命之病狀。儘管大多數患者一般恢復良好或完全恢復，但已報導約 20% 患者存在永久傷殘且 4% 至 15% 患者死亡。格巴二氏症候群可在呼吸道或胃腸道病毒感染症狀後數日或數週時出現。在一些情況下，手術或疫苗接種可觸發該症候群。該病症可經數小時或數日之時程發展，或其可持續 3 至 4 週。神經傳導速度 (NCV) 測試可向醫生提供線索以協助診斷。在一些情況下，脊椎抽液 (spinal tap) 可用於診斷中，因為格巴二氏症候群患者之腦脊髓液典型地比正常個體含有更多蛋白質。

儘管不存在用於格巴二氏症候群之已知治療，但用免疫球蛋白治療可減輕疾病之嚴重度且加速恢復。可以合適劑量向患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白，該合適劑量為諸如與用於向具有格巴二氏症候群之患者靜脈內

投予免疫球蛋白之劑量相類似之劑量。舉例而言，可向具有格巴二氏症候群之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之約 2 g/kg BW 之免疫球蛋白。舉例而言，此劑量可以 5 份 400 mg/kg BW 之劑量分連續 5 日投予。視例如可由熟習此項技術者容易地評估的疾病嚴重度及對治療之臨床反應而定，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

6. 特發性血小板減少性紫癍

亦稱作原發性免疫性血小板減少性紫癍及自體免疫性血小板減少性紫癍之特發性血小板減少性紫癍 (ITP) 為由抗血小板抗體導致血小板存活縮短所引起之血小板計數減少 (血小板減少症)。當血小板計數極低 (例如 $<30 \times 10^9/L$) 時，可出現血液滲出至皮膚 (紫癍) 及黏膜中。具有 ITP 之患者之骨髓血小板生成 (巨核細胞生成 (megakaryopoiesis)) 在形態上為正常的。在一些情況下，存在額外血小板功能障礙，其與結合至血小板表面上之醣蛋白之抗體有關。ITP 可以慢性及急性形式存在。約 80% 之具有 ITP 之成人具有慢性疾病形式。慢性 ITP 之最高發病率在年齡為 15 歲-50 歲之女性中，但一些報導暗示發病率隨年齡增加。ITP 相對常見於具有 HIV 之患者中。雖然 ITP 可見於感染之任何階段，但其發病率隨 HIV 疾病推進而增加。

研究已表明免疫球蛋白可用於治療具有 ITP 之患者 (Godeau 等人 (1993) Blood 82(5):1415-21; Godeau 等人 (1999) Br J Haematol 1999;107(4):716-9)。為治療具有 ITP

之患者，可以類似於用於靜脈內投予免疫球蛋白之劑量的劑量向患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白。舉例而言，可向具有 ITP 之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之約 1 g/kg 至 2 g/kg 之免疫球蛋白。此劑量可經若干天投予或可以一次劑量投予。在一些實例中，以 5 份 400 mg/kg BW 之免疫球蛋白之劑量分連續數日投予。在另一實例中，視血小板計數及臨床反應而定，投予 1 g/kg BW，持續連續 1-2 日。視例如可由熟習此項技術者容易地評估之血小板計數及對治療之臨床反應而定，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量及給藥頻率。

7. 發炎症肌病：多發性肌炎、皮肌炎及包涵體肌炎

發炎症肌病為涉及骨骼肌組織炎症及變性之一組肌肉疾病。此等疾病為後天的且皆呈現顯著肌肉無力及肌肉內存在發炎症反應。皮肌炎 (DM) 由於其特殊皮疹而為最易於識別之發炎症肌病，該皮疹以眼瞼、面頰及鼻樑上及背部或上胸部、肘、膝及關節上之片狀暗黑色、微紅或淡紫色皮疹之形式出現。在一些患者中，在皮膚下出現鈣化節結或硬化凸塊。皮疹常常先於肌肉無力，其典型地經數週之時段出現但可經數月或甚至數日出現。皮肌炎可出現於兒童期至成人期之任何年齡且女性比男性更常見。報導約三分之一的 DM 患者具有吞嚥困難。小於 25% 之具有 DM 之成人一般出現肌肉疼痛及觸痛，但多於 50% 之具有 DM 之兒童抱怨肌肉疼痛及觸痛。

多發性肌炎 (PM) 不具有皮肌炎之特徵性皮疹，且肌

肉無力之發作通常比 DM 進展更為緩慢。許多 PM 患者具有吞嚥困難。在一些情況下，患者亦具有歸因於肌肉衰竭之呼吸困難。多達三分之一的 PM 患者具有肌肉疼痛。與男性相比，較多女性感染該疾病，且年齡在 20 歲以下之人群很少感染該疾病，但已報導兒童期及嬰兒期多發性肌炎之病例。

包涵體肌炎 (IBM) 與多發性肌炎極類似。IBM 中之肌肉無力之發作通常極為漸進，經數月或數年發生。其與 PM 不同之處在於近端及遠端肌肉皆受到影響，而在 PM 中一般僅近端肌肉受到影響。典型發現包括腕屈肌及指屈肌無力。前臂萎縮為該疾病之特徵，且常見四頭肌萎縮及不同程度之其他肌肉無力。約一半患有 IBM 之患者具有吞嚥困難。IBM 之症狀通常在 50 歲後開始，但不排除任何年齡組。與女性相比，IBM 更常出現於男性中。約十分之一的 IBM 病例為遺傳性的。

研究指示投予免疫球蛋白可有益於具有此等發炎性肌病之患者。免疫球蛋白可改善肌肉力量，減輕炎症且減輕疾病進程及嚴重度 (Dalakas 等人 (1993) *N Engl J Med* 329(27):1993-2000 ; Dalakas 等人 (2001) *Neurology* 56(3):323-7 ; Dalakas (2004) *Pharmacol Ther* 102(3):177-93 ; Walter 等人 (2000) *J Neurol* 247(1):22-8)。可向具有 DM、PM 或 IBM 之患者以類似於用於靜脈內投予免疫球蛋白之劑量的劑量皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白。舉例而言，可典型地經若干天投予 2 g/kg BW 之免

疫球蛋白，諸如以 5 份 400 mg/kg BW 之劑量分連續數日投予。

8. 蘭伯特-伊頓肌無力症候群

蘭伯特-伊頓肌無力症候群 (LEMS) 為罕見之自體免疫性神經肌肉傳遞病症，其首先被認為臨床上與肺癌有關且隨後出現於未偵測出任何贅瘤之病例中。具有 LEMS 之患者具有突觸前神經肌肉接合點缺損。該疾病之臨床特徵在於近端肌肉無力 (練習後力量增加)，輕度動眼體征、深部腱反射壓抑及自主神經功能障礙 (口乾燥、便秘、勃起障礙)。向具有 LEMS 之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白可改善症狀。例示性劑量包括彼等用於向具有 LEMS 之患者靜脈內投予免疫球蛋白之劑量。舉例而言，可經由若干次給藥向具有 LEMS 之患者投予每公斤患者體重 2 g 之免疫球蛋白。舉例而言，可以 5 份 400 mg/kg BW 免疫球蛋白之劑量分連續 5 日投予。合適時，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

9. 多灶性運動神經病

具有傳導阻滯之多灶性運動神經病 (MMN) 為後天免疫介導性髓鞘脫失神經病，其具有緩慢漸進性無力、自發性收縮及痙攣而無顯著感覺受累。在診斷之前，疾病之持續時間處於若干月至多於 15 年之範圍內。MMN 之明確成因為未知的。組織病理學及電診斷研究表明存在髓鞘脫失及軸突損傷。主要影響運動神經，但已表明感覺神經中亦存在輕度髓鞘脫失。免疫調節及免疫抑制治療之功效進一

步支持 MMN 之免疫性質。在超過一半之具有 MMN 之患者中，抗 GM1 抗體之力價升高。儘管抗 GM1 抗體在該疾病中之作用為未知的，但其存在可用作 MMN 之診斷標誌。

向具有 MMN 之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白可改善症狀。例示性劑量包括彼等用於向具有 MMN 之患者靜脈內投予免疫球蛋白之劑量。舉例而言，可經由若干次給藥向具有 MMN 之患者投予每公斤患者體重 2 g 之免疫球蛋白。舉例而言，可以 5 份 400 mg/kg BW 免疫球蛋白之劑量分連續 5 日投予。在另一實例中，1 g/kg BW 可分連續 2 日投予。可向一些患者給予維持治療，其可包括例如每 2-6 週給予 400 mg/kg BW 至 2 g/kg BW 之劑量。考慮患者反應，合適時，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

10. 重症肌無力

重症肌無力 (MG) 為慢性自體免疫性神經肌肉疾病，其特徵在於身體骨骼肌不同程度之無力。其與存在針對乙醯膽鹼受體 (AChR) 之抗體有關或與神經肌肉接合點處之肌肉特異性酪胺酸激酶 (MuSK) 有關，但一些患者為抗體陰性的。MG 之臨床特徵包括波動性無力及隨意肌之易疲勞性 (尤其提上瞼肌、眼外肌、眼球肌、肢體肌肉及呼吸肌)。患者通常呈現眼瞼單側或雙側下垂 (下垂)、複視、吞嚥困難及近端肌肉無力。在嚴重狀況下或在急性嚴重惡化 (肌無力危症) 中，呼吸肌無力可引起呼吸衰竭。重症肌無力出現於所有種族群體及兩種性別中。其最常感染低於 40 歲之年輕成人女性及高於 60 歲之年長男性，但其可出現於任

何年齡。在一些情況下，可進行胸腺切除術以減輕症狀。

典型地當其他治療無效或引起嚴重副作用時，可將免疫球蛋白例如作為維持治療用於具有中度至重度 MG 之患者，且亦可在胸腺切除術之前或疾病急性惡化（肌無力危症）期間投予免疫球蛋白。可使用本文中所述之方法向具有重症肌無力之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白。例示性劑量包括彼等用於向具有 MG 之患者靜脈內投予免疫球蛋白之劑量。舉例而言，可向具有 MG 之患者每 4 週-6 週投予 400 mg/kg BW 至 2 g/kg BW 之劑量以供維持治療。胸腺切除術之前或肌無力危症期間，可經由若干次給藥來投予 1 g/kg BW-2 g/kg BW，諸如以 5 份 400 mg/kg BW 之劑量分連續 5 日投予。在另一實例中，1 g/kg BW 可分連續 2 日投予。

11. 莫氏-沃特曼症候群

亦稱作僵人症候群之莫氏-沃特曼症候群為具有自體免疫疾病特徵之罕見神經病症。患者呈現與肌肉僵硬及併發陣發性痙攣有關之症狀。肌肉僵硬波及主要腹部及胸腰部肌肉之中軸肌肉以及近端肢體肌肉。軀幹主動肌及拮抗肌共同收縮典型地導致具有脊柱前凸過度之板狀外觀。較不常見的是，呼吸肌受累導致呼吸困難且面部肌肉受累導致假面樣面容。用免疫球蛋白治療可達成具有莫氏-沃特曼症候群之患者之僵硬減輕及敏感性評分增高（Dalakas 等人 (2001) N Engl J Med 345(26):1870-6）。可使用本文中所述之方法向具有莫氏-沃特曼症候群之患者皮下投予與玻尿酸酶

組合之免疫球蛋白。例示性劑量包括彼等用於向具有莫氏-沃特曼症候群之患者靜脈內投予免疫球蛋白之劑量。舉例而言，免疫球蛋白可以 400 mg/kg BW 之劑量分連續 5 日投予。可向一些患者給予維持治療，其可包括例如每 4-6 週投予 1 g/kg BW-2 g/kg BW 免疫球蛋白。合適時，可增加或降低所投予之免疫球蛋白量。

12. 其他疾病及病狀

臨床資料指示免疫球蛋白可用於治療許多病狀。在一些情況下，免疫球蛋白可用作一線治療，然而，在其他狀況下，當標準治療經證明無效、變得不可耐受或顯示不當時，可投予免疫球蛋白以作為二線治療。識別該等疾病或病狀係在治療醫師之技術範圍內。此等疾病或病狀之實例包括（但不限於）繼發性低 γ 球蛋白血症（包括醫原性免疫缺乏症）；特異性抗體缺乏；急性播散性腦脊髓炎；ANCA 陽性全身壞死性脈管炎；自體免疫溶血性貧血；大水皰性天疱瘡樣病；癩痕性天疱瘡樣病；伊文氏症候群（包括具有免疫性血小板減少症之自體免疫溶血性貧血）；母胎/新生兒同種免疫性血小板減少症（FMAIT/NAIT）；阿耳滋海默氏病；噬血細胞症候群；高風險同種異體造血幹細胞移植；IgM 副蛋白血症神經病；腎移植；多發性硬化；眼陣攣肌陣攣運動失調；落葉型天疱瘡；尋常天疱瘡；輸血後紫癍；中毒性表皮壞死溶解/史蒂芬強生症候群（TEN/SJS）；中毒性休克症候群；全身性紅斑狼瘡；多發性骨髓瘤；膿毒病；骨髓移植；B 細胞腫瘤；及創傷。

免疫球蛋白亦已展示具有針對多種細菌、病毒及真菌感染之抗微生物活性，該等細菌、病毒及真菌包括（但不限於）B型流感嗜血桿菌、A型及B型綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌、B群鏈球菌、1型、3型、4型、6型、7型、8型、9型、12型、14型、18型、19型及23型肺炎鏈球菌、2型及5型腺病毒、細胞巨大病毒、E-B病毒VCA、A型肝炎病毒、B型肝炎病毒、疱疹單純型病毒-1、疱疹單純型病毒-2、A型流行性感冒、麻疹、1型、2型及3型副流行性感冒、脊髓灰質炎、水痘帶狀疱疹病毒、麴菌及白色念珠菌。因此，可向具有細菌、病毒及真菌感染之患者皮下投予與玻尿酸酶組合之免疫球蛋白以強化患者之免疫系統且治療疾病。在一些實例中，亦可投予抗生素或其他抗微生物劑。

I. 製品及套組

可將共同或分別提供之免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶之醫藥組合物包裝成製品，該等製品含有包裝材料、有效用於治療IG可治療性疾病或病狀之醫藥組合物及指示組合物及組合打算用於治療IG可治療性疾病及病狀之標籤。例示性製品為包括單腔室及雙腔室容器之容器。容器包括（但不限於）管、瓶及注射器。容器可進一步包括用於皮下投藥之針。

本文中所提供之製品含有包裝材料。用於包裝醫藥產品之包裝材料為熟習此項技術者所熟知。例如參見美國專利第5,323,907號、第5,033,252號及第5,052,558號，其每

一者係全部併入本文中。醫藥包裝材料之實例包括（但不限於）發泡包裝、瓶、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器、瓶及適用於所選調配物及預期投藥及治療模式之任何包裝材料。預期本文中所提供之化合物及組合物之多種調配物為對任何 IG 可治療性疾病或病狀之多種治療。

共同或分別提供之免疫球蛋白及可溶性玻尿酸酶之組合物亦可以套組形式提供。套組可包括本文中所述之醫藥組合物及用於投藥之項目。舉例而言，組合物可與諸如注射器、吸入器、劑量杯、滴管或塗藥器之用於投藥之裝置一起提供。套組可視情況包括關於包括劑量、給藥攝生法之應用之說明書及關於投藥模式之說明書。套組亦可包括本文中所述之醫藥組合物及用於診斷之項目。舉例而言，該等套組可包括用於量測 IG 之濃度、量或活性之項目。

J. 實施例

僅出於說明性目的而包括下列實施例且該等實施例不意欲限制本發明之範疇。

實施例 1

可溶性重組人類 PH20 (rHuPH20) 促進免疫球蛋白 (IG) 之皮下投藥及生物可用率

與靜脈內 (IV) 投藥相比，免疫球蛋白 (IG) 之皮下 (SQ) 投藥引起生物可用率降低。一項研究報導與 IV 投藥相比之 63% 生物可用率，從而需要使用 IV 劑量之 137% 之 SQ 劑量來達成相等生物可用率 (亦即，時間-濃度曲線下之面積 (AUC)) (Ochs 等人 (2006) J Clin. Immunol.,

26:265-273)。因此，進行實驗來測定在可溶性重組人類 PH20 (rHuPH20) 存在下皮下投予 IG (GAMMAGARD LIQUID (GGL) , Baxter Biosciences) 是否會增加 SQ 投藥後 IG 之生物可用率，從而排除增加劑量之必要。實驗研究經設計以評定 1) 經由皮下 (SQ) 途徑個體在單個部位耐受 GGL 之每月劑量之能力；2) 在僅僅輕度局部不良藥物反應之情況下耐受每月 GGL 劑量所需之每公克 GGL rHuPH20 劑量；3) SC 投藥所需之時間；及 4) 比較藉由 GGL 之曲線下面積 (AUC) 所量測之 IV 生物可用率與 SQ 生物可用率。

簡而言之，11 個免疫缺乏症成人患者參與研究中，其接受穩定靜脈內 γ 球蛋白 (IVIG) 劑量。所有患者保持與其在研究前所接受之劑量相同之每月 IVIG 劑量。關於皮下投藥，每四週以 IV 方式接受至多每公斤體重 600 mg GGL 之患者在單個部位以 4 週 IV 劑量之 $\frac{1}{4}$ 之劑量 (亦即 1 週劑量) 開始接受 SQ 輸注以測定耐受 1 週劑量所需之 rHuPH20 劑量。隨後，降低 rHuPH20 劑量且患者接受 2 週 GGL 劑量、3 週 GGL 劑量且最終完全 4 週 GGL 劑量以測定耐受每月一次 GGL 之 SQ 輸注所需之最少 rHuPH20。

使用每公克 GGL 150 U rHuPH20 進行初始輸注。在輸注 GGL 之前，經由 24 號 SQ 針以 1 ml/min.-2 ml/min. 之速率投予濃度為 150 U/ml 或 1500 U/ml 之 rHuPH20。若使用 1500 U/ml rHuPH20，則其如下稀釋：a) 若所需濃縮 rHuPH20 溶液 (1500 U/ml) 之體積為 1.5 ml 或 1.5 ml 以下，則使用

注射用生理鹽水以 1:10 將其稀釋；b) 若所需濃縮 rHuPH20 (1500 U/ml) 之體積高於 1.5 ml 但低於 15 ml，則用注射用生理鹽水將其稀釋至 15 l；c) 若所需濃縮 rHuPH20 溶液 (1500 U/ml) 之體積為 15 ml 或 15 ml 以上，則其以未稀釋形式使用。

在輸注 rHuPH20 後 (且在 5 分鐘內) 立即經由相同 24 號 SQ 針自 4 週劑量之 $\frac{1}{4}$ 之劑量 (亦即 1 週劑量) 開始輸注 GGL 以測定在單個部位給予 4 週劑量之四分之一所需的 rHuPH20 量。若耐受輸注，則評定每一患者以供測定；若存在中度或重度局部反應，則認為不耐受輸注，從而需要不只一處投藥部位或不能在不到 3 小時內完成輸注。若耐受每週 GGL 劑量，則使用 100 U/g GGL 之 rHuPH20 來投予一半劑量 (2 週劑量) 且 rHuPH20 之劑量進一步降低至 66 U/g GGL，接著 50 U/g GGL。重複以每公克 GGL 計之 rHuPH20 劑量，其中增加 GGL 量直至在單個部位耐受完全 4 週 GGL 劑量。若在任一點處不耐受 rHuPH20 量，則接著以下一時間間隔重複每週 GGL 劑量且增加 rHuPH20 量直至耐受該劑量。若個體不能耐受 rHuPH20 劑量 2 次連續增加之劑量 (亦即以 GGL 之各別劑量 3 次嘗試)，則接著將先前耐受劑量判定為最大耐受劑量。

僅評估前 4 名患者之可耐受性；最後 7 名患者經 IV 輸注，繼而進行藥物動力學 (PK) 研究以比較 IV 輸注與後繼 SQ 輸注。關於 SQ 輸注，在達成 GGL 之每月劑量投藥後，重複相同每月劑量且進行 PK 研究以評估 $T_{1/2}$ 、 T_{max} 及

AUC。若 AUC (SQ) 不在 AUC (IV) 之 90% 範圍內，則在下次輸注時將 rHuPH20 劑量增加 4 倍且重複 PK 評定。

11 名患者中有 10 名患者在單個 SQ 部位以 120 毫升/小時至 300 毫升/小時之速率達成 25.5 公克至 61.2 公克 GGL (255 ml 至 612 ml) 之每月劑量。第 11 名患者在 1 週輸注引發局部不適後退出。對於第一名患者 (39001) 而言，藉由重力進行初始輸注。然而，儘管 rHuPH20 劑量自 150 U/g GGL 增加至 300 U/g GGL，但速率為不可接受的。因此，所有後繼輸注皆使用 IV 蠕動泵來進行。剩餘 9 名患者不需要重複劑量或增加 rHuPH20 濃度之情況下達成 GGL 每月劑量。因此，嘗試降低 rHuPH20 劑量之所有 9 名患者完成本研究且能夠耐受使用 50 U/g GGL 之輸注。為測定 50 U/g GGL 是否為可投予之最少 rHuPH20，對兩名患者嘗試 25 U/g GGL 之劑量而未成功：一者具有不適且另一者之可耐受性降低且需要在兩個部位投藥。因此，允許 GGL 之每月劑量投藥 (SQ) 的 rHuPH20 之最小量為 50 U/g GGL。結果概述於下表 3 中。結果展示除前兩名患者以外所有患者以至多 300 ml/hr 之速率經輸注 1.64 h (270 ml) 至 3.55 h (537 ml) 之輸注時間。主要藉由所用之泵類型來限制投藥速率。IV 泵常常在快速輸注速率下發出警報。一者減慢輸注且一者歸因於輕度輸注部位疼痛而中斷輸注。兩者輸注恢復且完成。

| 個體 (N=10) | 每月劑量輸注數 | 所輸注 IgG 劑量 (g) (平均值) | 所輸注 IgG 體積 (mL) (平均值) | 最 終 rHuPH20 濃度 (U/g) | 最大輸注 速 率 (mL/hr) | 輸注時間 (hr) (平均值) |
|-----------|---------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| 390001 | 1 | 25.5 | 255 | 305.9 | 175 | 2.13 |
| 390003 | 1 | 30.1 | 301 | 46.9 | 200 | 2.38 |
| 400001 | 1 | 44.5 | 445 | 49.8 | 300 | 3.05 |
| 340001 | 3 | 30.3 | 303 | 52.5 | 300 | 3.02 |
| 340002 | 4 | 39.9 | 399 | 50.0 | 300 | 3.20 |
| 390004 | 4 | 29.3 | 293 | 50.8 | 300 | 1.92 |
| 390005 | 3 | 27.2 | 272 | 50.6 | 300 | 1.64 |
| 390006 | 3 | 61.4 | 614 | 50.0 | 300 | 2.75 |
| 400002 | 3 | 53.7 | 537 | 51.5 | 300 | 3.55 |
| 400003 | 3 | 42.1 | 421 | 48.8 | 300 | 2.29 |

1. 可耐受性評定

對個體評定其對 SQ 輸注之可耐受性。大部分輸注僅與輕度輸注相關反應有關 (表 4)。最常見之輕度反應為輸注部位紅斑、疼痛、腫脹、發熱及搔癢。中度輸注部位反應包括三個疼痛病例及各一搔癢、腫脹及發熱病例。未報導重度反應。在 10 次輸注中在輸注 rHuPH20 期間，存在短暫高熱之不適，1 名患者 5 次輸注出現該等不適。

| MeDRA 系統器官分類 | SC ¼劑量 | SC ½劑量 | SC ¾劑量 | SC 全劑量 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| 耳部及迷路病症 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 眼部病症 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 胃腸病症 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 一般病症及投藥部位病狀 | 26 | 15 | 20 | 29 |
| 免疫系統病症 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 感染及侵染 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 肌肉骨骼及結締組織病症 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 神經系統病症 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 呼吸道、胸部及縱隔病症 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 皮膚及皮下組織病症 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 合計 | 30 | 20 | 25 | 44 |

認為可能或也許與輸注有關之全身性不良事件列於表 5 中。三者為中度的且無一者為重度的。僅輕度胸痛事件與中斷輸注有關，但仍完成輸注且對後繼輸注良好耐受。表 6 描述完成皮下輸注而未因不良反應中斷之比例。

1 名患者出現一種重度不良事件（過敏性反應），其與研究治療無關。該患者具有對抗生素之既往過敏反應病史，其在輸注 GGL/rHuPH20 後第二天接受抗生素，且隨後出現過敏性反應。此患者完全恢復且能夠成功完成研究。

在此 PID 患者試驗期間，不存在所記錄之細菌感染。存在 9 個所報導之病毒感染病例，皆不認為與研究治療有關：2 個病毒性胃腸炎病例、1 個疱疹性角膜炎病例、2 個鼻竇炎病例、1 個結膜炎病例及 3 個類流行性感冒疾病病例（出現於 1 名患者）。

| 不良事件 (MEDRA 術語) | 輕度 | 中度 | 重度 | 合計 |
|-----------------|----|----|----|----|
| 眼乾 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 盜汗 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 肌肉骨骼不適 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 頭痛 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| 嗜睡 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 胸痛 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 周邊性水腫 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 疼痛 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 背痛 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 合計相關不良事件 | 9 | 3 | 0 | 12 |

表 6：完成 SC 輸注而未因不良事件中斷之比例

| 患者 | 未中斷 | 百分比 (%) | 中斷 | 停止 | 百分比 (%) | 總輸注 |
|--------|-----|---------|----|----|---------|-----|
| 390001 | 4 | 80 | 1* | 0 | 20 | 5 |
| 390002 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 390003 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 400001 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 340001 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 340002 | 6 | 86 | 1† | 0 | 14 | 7 |
| 390004 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 390005 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 390006 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 400002 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 400003 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 合計 | 59 | 無 | 2 | 0 | 無 | 61 |

*由於輕度輸注部位疼痛而中斷

†由於輕度短暫性胸痛而中斷

2. 藥物動力學評定

對血清 IgG 含量進行藥物動力學 (PK) 分析。參與此研究之 PK 評定階段之 7 名患者在單個部位使用每公克 GGL 50 U rHuPH20 達成 27 公克 GGL 至 61 公克 GGL 之每月劑量 (參見表 3)。在接受 GGL 之第二每月劑量輸注後進行 PK 研究。收集輸注前、輸注後第 1 小時及輸注後第 1、2、3、4、5、7、14、21 及 28 天 (若以 28 天時程) 之血清樣品。7 名患者之藥物動力學參數描述於表 7 中。7 名患者之 AUC (SQ) 與 AUC (IV) 之比率展示於表 8 中。結果展示 7 名患者中之 5 名患者具有處於 AUC (IV) 之 90% 範圍內的 AUC (SQ)。使比率小於 90% 之 2 名個體之 rHuPH20 劑量增加 4 倍並未進一步改良生物可用率。

表 7：個別個體之藥物動力學參數

| 患者 | AUC (天·公克/公升) | T _½ (天) | T _{max} (天) | C _{min} (公克/公升) |
|--------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| 34001 | 461.2 | 61.3 | 3.0 | 12.9 |
| 34002* | 387.1 | 114.1 | 4.9 | 11.3 |
| | 356.7 | 43.9 | 4.0 | 11.3 |
| 39004* | 256.9 | 113.8 | 5.0 | 7.9 |
| | 264.2 | 44.3 | 6.9 | 7.7 |
| 39005 | 369.6 | 59.3 | 3.1 | 10.9 |
| 39006 | 368.9 | 40.3 | 4.8 | 10.8 |
| 40002 | 375.2 | 33.7 | 6.8 | 10.6 |
| 40003 | 356.2 | 37.9 | 4.9 | 9.7 |
| 中值 | 368.9 | 43.93 | 4.8 | 10.8 |

*以增加之 rHuPH20 劑量投藥後重複 PK 評定之患者

表 8：AUC_(SQ)與 AUC_(IV)之比率 (%)

| 患者 | rHuPH20 濃度 | |
|-------|------------|---------|
| | 50 U/g | 200 U/g |
| 34001 | 101.0 | 無 |
| 34002 | 86.5 | 79.6 |
| 39004 | 75.8 | 77.8 |
| 39005 | 102.7 | 無 |
| 39006 | 94.7 | 無 |
| 40002 | 97.3 | 無 |
| 40003 | 90.5 | 無 |
| 平均值 | 92.6 | 無 |

3. 結果概述

在此研究中，在輸注 GGL 之前藉由注射使用 rHuPH20 使得在單個皮下部位以至多每小時 300 ml 之輸注速率輸注多達 600 ml GGL 成為可能。主要藉由所用之 IV 泵來限制速率，該等 IV 泵經設計以當 IV 滲透及壓力增加時發出警報且關閉。儘管泵直至速率接近 300 ml/h 時才出現關閉，但重新啟動泵之需要增加輸注時間。由於對於皮下投藥而

言，不存在對壓力警報之需要，因此藉由更換成能夠在不發出警報之情況下產生更高壓力之泵來消除關閉問題。

儘管大部分輸注與一些腫脹、發紅或偶而疼痛或發癢有關，但除少數以外皆為輕度的。6 個中有兩個在輸注中出現中度反應，其中降低 rHuPH20 以試圖找到最小有效劑量；11 名個體中有 10 名個體耐受 50 U/g GGL 之 rHuPH20 劑量。先前未經受皮下輸注之一名個體在下腹部部位出現第一週劑量引起之不適後退出。儘管出現輕度反應，但所有其他輸注皆完成，其中 97% 之輸注在無中斷之情況下完成。大部分反應用冷卻包處理且僅少數反應需要乙醯胺苯酚或苯海拉明。

在與 rHuPH20 組合皮下投予後，平均 GGL 生物可用率為 IV 投藥後 GGL 生物可用率之 92%。此研究暗示由 rHuPH20 所提供之擴散增加改良 GGL 之吸收。此外，在此研究中由每月皮下給予 GGL 所達成之最低含量與由 IV 投藥所達成之最低含量相同。因此，相對於 IV 給藥，不需要增加皮下給予 GGL 之投藥頻率；皮下投予與 rHuPH20 組合之 GGL 僅需要單個 SQ 部位且可以至多 300 ml/h 之輸注速率達成。

總之，rHuPH20 有助於在成人免疫缺乏個體之群體中以至多 300 ml/h 之速率在單個部位投予完全每月 GGL 劑量。基於 IgG 濃度隨時間變化曲線之 AUC，該組合之生物可用率為 IV 生物可用率之 92%。此結果暗示 rHuPH20 改良皮下投予之 GGL 之吸收。大部分局部副作用為輕度的且不

導致輸注減慢或中斷。

實施例 2

可溶性 rHuPH20 表現細胞系之產生

使用 HZ24 質體 (SEQ ID NO:52 中所闡明) 轉染中國倉鼠卵巢 (CHO 細胞) (參見例如申請案第 10,795,095 號、第 11/065,716 號及第 11/238,171 號)。用於表現可溶性 rHuPH20 之 HZ24 質體載體含有 pCI 載體骨架 (Promega)、編碼人類 PH20 玻尿酸酶 (SEQ ID NO:49) 之 1-482 位胺基酸之 DNA、來自 ECMV 病毒 (Clontech) 之內部核糖體進入位點 (IRES) 及小鼠二氫葉酸還原酶 (DHFR) 基因。pCI 載體骨架亦包括編碼 β -內醯胺酶耐藥基因 (AmpR) 之 DNA、f1 複製起點、細胞巨大病毒即刻早期增強子/啟動子區 (CMV)、嵌合內含子及 SV40 晚期聚腺苷酸化信號 (SV40)。編碼可溶性 rHuPH20 構築體之 DNA 含有在編碼人類 PH20 之天然 35 個胺基酸信號序列之 1 位胺基酸位置上的甲硫胺酸的 DNA 之前的 NheI 位點及 Kozak 一致序列, 及在編碼對應於人類 PH20 玻尿酸酶 (SEQ ID NO:1 中所闡明) 之 482 位胺基酸位置之酪胺酸的 DNA 之後的終止密碼子, 繼之以 BamHI 限制位點。構築體 pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) 因此在 CMV 啟動子驅動下產生單一 mRNA 物質, 其編碼由內部核糖體進入位點 (IRES) 所分離之人類 PH20 (SEQ ID NO:3 中所闡明) 之 1-482 位胺基酸及小鼠二氫葉酸還原酶 (SEQ ID NO:53 中所闡明) 之 1-186 位胺基酸。

未轉染之 DG44 CHO 細胞在補充有 4 mM 麩胺醯胺及 18 ml/L Plurionic F68/L (Gibco) 之用於 DHFR(-)細胞之 GIBCO 改良 CD-CHO 培養基中生長，且以 0.5×10^6 個細胞/毫升接種於震盪燒瓶中以為轉染作準備。在加濕培育箱中使細胞在 37°C 下於 5% CO₂ 中生長，同時以 120 rpm 震盪。在轉染前測試指數生長之未轉染 DG44 CHO 細胞之活力。

使未轉染之 DG44 CHO 細胞培養物之 6 千萬個活細胞粒化且以 0.7 mL 之 2×轉染緩衝液 (2×HeBS: 40 mM HEPES (pH=7.0)、274 mM NaCl、10 mM KCl、1.4 mM Na₂HPO₄、12 mM 右旋糖) 中 2×10^7 個細胞之密度再懸浮。向再懸浮細胞之每一等分試樣中添加 0.09 mL (250 μg) 線狀 HZ24 質體 (藉由使用 Cla I (New England Biolabs) 消化隔夜而經直線化)，且在室溫下將細胞/DNA 溶液轉移至 0.4 cm 間隙之 BTX (Gentronics) 電穿孔管中。在未將質體 DNA 與細胞混合之情況下進行陰性對照電穿孔。在 330 V 及 960 μF 或 350 V 及 960 μF 之電容器放電下對細胞/質體混合物進行電穿孔。

電穿孔後自電穿孔管移除細胞且轉移至 5 mL 補充有 4 mM 麩胺醯胺及 18 ml/L Plurionic F68/L (Gibco) 之用於 DHFR(-)細胞之改良 CD-CHO 培養基中且在加濕培育箱中使其在未經選擇之情況下在 6 孔組織培養板之孔中於 37°C 下 5% CO₂ 中生長 2 天。

電穿孔後第 2 天，自各孔移除 0.5 mL 組織培養基且使用實施例 3 中所述之微濁度檢定來測試玻尿酸酶活性之存

在。

| | 稀釋度 | 活性 單位/毫升 |
|-----------|------|----------|
| 轉染 1 330V | 1:10 | 0.25 |
| 轉染 2 350V | 1:10 | 0.52 |
| 陰性對照 | 1:10 | 0.015 |

自組織培養孔收集來自轉染 2 (350 V) 之細胞，計數且稀釋至每毫升 1×10^4 至 2×10^4 個活細胞。將細胞懸浮液之 0.1 mL 等分試樣轉移至 5 個 96 孔圓底組織培養板之各孔中。向容納細胞之孔中添加 100 微升含有 4 mM GlutaMAX™-1 補充劑 (GIBCO™, Invitrogen 公司) 且不含次黃嘌呤及胸苷補充劑之 CD-CHO 培養基 (GIBCO) (最終體積為 0.2 mL)。

自在無甲胺喋呤之情況下生長之 5 塊板識別出 10 個純系。

表 10. 所識別之純系的玻尿酸酶活性

| 板/孔 ID | 相對玻尿酸酶 |
|--------|--------|
| 1C3 | 261 |
| 2C2 | 261 |
| 3D3 | 261 |
| 3E5 | 243 |
| 3C6 | 174 |
| 2G8 | 103 |
| 1B9 | 304 |
| 2D9 | 273 |
| 4D10 | 302 |

使 6 個 HZ24 純系在培養物中繁殖且以單細胞懸浮液形

式轉移至震盪燒瓶中。使用二維無限稀釋策略將純系 3D3、3E5、2G8、2D9、1E11 及 4D10 鋪於 96 孔圓底組織培養板中，在該策略中自上部左手邊孔中之 5000 個細胞開始沿板向下以 1:2 稀釋細胞且沿板橫向以 1:3 稀釋細胞。所稀釋之純系在每孔 500 個未轉染之 DG44 CHO 細胞之背景中生長以提供培養初始數日所需之生長因子。每個次純系使用 10 塊板，5 塊板含有 50 nM 甲胺喋呤且 5 塊板不含甲胺喋呤。

純系 3D3 產生 24 個可見次純系(13 個次純系來自未經甲胺喋呤處理之板且 11 個次純系來自經 50 nM 甲胺喋呤處理之板)。在來自 24 個次純系中之 8 者之上清液中量測到顯著玻尿酸酶活性 (>50 單位/毫升)，且使此 8 個次純系繁殖至 T-25 組織培養燒瓶中。在 50 nM 甲胺喋呤存在下，使自甲胺喋呤處理方案分離之純系繁殖。在震盪燒瓶中，使純系 3D35M 在 500 nM 甲胺喋呤中進一步繁殖，得到產生超過 1,000 單位/毫升之純系 (純系 3D35M；或 Gen1 3D35M)。接著製備 3D35M 細胞之母細胞庫 (master cell bank, MCB)。

實施例 3

測定可溶性 rHuPH20 之玻尿酸酶活性

使用濁度檢定來測定諸如細胞培養物、純化部分及純化溶液之樣品中之可溶性 rHuPH20 的玻尿酸酶活性，該濁度檢定係基於當玻尿酸與血清白蛋白結合時形成不溶性沈澱。藉由將可溶性 rHuPH20 與玻尿酸鈉 (玻尿酸) 培育固定時段 (10 分鐘) 且接著添加酸化之血清白蛋白使未消化

之玻尿酸鈉沈澱來量測活性。30 分鐘發生時段後，在 640 nm 下量測所得樣品之濁度。由酶對玻尿酸鈉受質之活性所引起之濁度降低為可溶性 rHuPH20 玻尿酸酶活性之量度。使用由稀釋可溶性 rHuPH20 檢定工作參照標準所產生之校正曲線來進行該方法，且相對於此校正曲線進行樣品活性量測。

在酶稀釋劑溶液中製備樣品之稀釋液。酶稀釋劑溶液係藉由將 $33.0 \text{ mg} \pm 0.05 \text{ mg}$ 水解明膠溶解於 25.0 mL 之 50 mM PIPES 反應緩衝液（140 mM NaCl、50 mM PIPES，pH=5.5）及 25.0 mL SWFI 中且將 0.2 mL 之 25% Buminate 溶液稀釋至混合物中且渦旋 30 秒來製備。在使用 2 小時內進行此製備且冰上儲存直至需要。將樣品稀釋至估計 1-2 U/mL。一般而言，每步驟最大稀釋度不超過 1:100 且用於第一稀釋之初始樣品體積不小於 20 μL 。進行該檢定所需之最小樣品體積為：處理中樣品、FPLC 溶離份：80 μL ；組織培養上清液：1 mL；濃縮物質：80 μL ；純化或最終步驟物質：80 μL 。將稀釋液在低蛋白結合 96 孔板中製成三份，且將 30 μL 每一稀釋液轉移至 Optilux 黑色/透明底板（BD BioSciences）中。

在酶稀釋劑溶液中製備濃度為 2.5 U/mL 之已知可溶性 rHuPH20 之稀釋液以產生標準曲線且分三份添加至 Optilux 板中。稀釋液包括 0 U/mL、0.25 U/mL、0.5 U/mL、1.0 U/mL、1.5 U/mL、2.0 U/mL 及 2.5 U/mL。在板中包括容納 60 μL 酶稀釋劑溶液之「試劑空白」孔作為陰性對照。接著蓋上

板且在 37°C 下在加熱塊 (heat block) 上加熱 5 分鐘。移除蓋子且將板震盪 10 秒。震盪後，將板放回至加熱塊上且用溫熱之 0.25 mg/mL 玻尿酸鈉溶液 (藉由將 100 mg 玻尿酸鈉 (LifeCore Biomedical) 溶解於 20.0 mL SWFI 來製備) 填充 MULTIDROP 384 液體操作裝置。藉由在 2°C-8°C 下輕輕旋轉及/或搖動 2-4 小時或直至完全溶解來使其混合。將反應板轉移至 MULTIDROP 384 且藉由按下開始鍵開始反應以將 30 μ L 玻尿酸鈉分配至各孔。接著自 MULTIDROP 384 移除該板且震盪 10 秒，之後在放回板蓋之情況下轉移至加熱塊上。在 37°C 下將該板培育 10 分鐘。

藉由用血清工作溶液預充 MULTIDROP 384 且將體積設置變化至 240 μ L 來使該機器準備停止反應 (於 75 mL 之 500 mM 乙酸鹽緩衝溶液中之 25 mL 血清儲備溶液 [用 9 體積 500 mM 乙酸鹽緩衝溶液稀釋 1 體積馬血清 (Sigma) 且用鹽酸將 pH 調節至 3.1])。自加熱塊移除板且置放於 MULTIDROP 384 上且將 240 μ L 血清工作溶液分配至孔中。移除該板且在板讀取器上震盪 10 秒。另外 15 分鐘後，在 640 nm 處量測樣品濁度且藉由擬合於標準曲線來測定各樣品之玻尿酸酶活性 (以 U/mL 計)。

藉由用玻尿酸酶活性 (U/ml) 除以蛋白質濃度 (mg/mL) 來計算比活性 (單位/毫克)。

實施例 4

Gen1 人類 sPH20 之製備及純化

A. 5 L 生物反應器製程

使一瓶 3D35M 融化且自震盪燒瓶經由 1 L 旋轉式燒瓶在補充有 100 nM 甲胺喋呤及 GlutaMAX™-1 (Invitrogen) 之 CD-CHO 培養基 (Invitrogen, Carlsbad Calif.) 中繁殖。以每毫升 4×10^5 個活細胞之接種密度將細胞自旋轉式燒瓶轉移至 5 L 生物反應器 (Braun)。參數為 37°C 之溫度設定點、7.2 之 pH (開始設定點)、25% 之溶氧設定點及 0 cc/min-100 cc/min 之空氣覆蓋。第 168 小時，添加 250 ml 1 號補料培養基 (具有 50 g/L 葡萄糖之 CD CHO)。第 216 小時，添加 250 ml 2 號補料培養基 (具有 50 g/L 葡萄糖及 10 mM 丁酸鈉之 CD CHO)，且第 264 小時，添加 250 ml 2 號補料培養基。此製程以 6×10^6 個細胞/毫升之最大細胞密度產生每毫升 1600 單位之最終生產率。在最終製備階段，添加丁酸鈉顯著增強可溶性 rHuPH20 之產生。

藉由深層過濾及向 10 mM HEPES (pH 為 7.0) 中之切向流過濾作用以使來自 3D35M 純系之條件培養基淨化。可溶性 rHuPH20 接著藉由 Q 瓊脂糖 (Pharmacia) 離子交換、苯基瓊脂糖 (Pharmacia) 疏水性相互作用層析、苯基酉朋酸酯 (Prometics) 及羥基磷灰石層析 (Biorad, Richmond, CA) 之連續層析來純化。

可溶性 rHuPH20 與 Q 瓊脂糖結合且以於相同緩衝液中之 400 mM NaCl 溶離。用 2 M 硫酸銨將溶離液稀釋至 500 mM 硫酸銨之最終濃度且通過苯基瓊脂糖 (low sub) 管柱，繼而在相同條件下與苯基酉朋酸酯樹脂結合。在無硫酸銨之情況下，在 pH9.0 下於 50 mM N-二甘胺酸 (bicine) 中洗

滌後，在 Hepes (pH=6.9) 中自苯基瓊脂糖溶離可溶性 rHuPH20。將溶離液負載於 5 mM 磷酸鉀及 1 mM CaCl₂ 中之陶瓷羥基磷灰石樹脂 (pH=6.9) 上且用具有 0.1 mM CaCl₂ 之 80 mM 磷酸鉀 (pH=7.4) 溶離。

使用 USP 參照標準經由微濁度檢定 (實施例 16)，所得經純化之可溶性 rHuPH20 具有超過每毫克蛋白質 65,000 USP 單位之比活性。經純化之 sPH20 自 Pharmacia 5RPC 苯乙烯二乙烯苯管柱自第 24 分鐘至第 26 分鐘在單個峰下溶離，梯度處於 0.1% TFA/H₂O 與 0.1% TFA/90% 乙腈/10% H₂O 之間且藉由 SDS 電泳解析為單個寬 61 kDa 條帶，用 PNGASE-F 處理後，其縮減為清晰 51 kDa 條帶。N 末端胺基酸定序揭示已有效移除前導肽。

B. 上游細胞培養物至 100 L 生物反應器細胞培養物中之繁殖 (expansion) 製程

使用按比例放大製程來自 4 瓶不同 3D35M 細胞分別純化可溶性 rHuPH20 以產生 4 個分開批次之 sHuPH20：HUA0406C、HUA0410C、HUA0415C 及 HUA0420C。經由 125 L 生物反應器使各瓶細胞分別繁殖且培養，接著使用管柱層析純化。在整個製程期間獲得樣品以評定如酶產率之該等參數。下文所提供之製程描述闡明如生物反應器開始及補料培養基體積、轉移細胞密度及洗滌及溶離體積之該等情況之代表性說明。各批次之確切數字略有不同，且詳細描述於表 11 至 18 中。

在 37°C 水浴槽中將 4 瓶 3D35M 細胞融化，添加含有 100

nM 甲胺喋呤及 40 mL/L GlutaMAX 之 CD CHO 且將細胞離心。在 125 mL 震盪燒瓶中用 20 mL 新鮮培養基使細胞再懸浮且置放於 37°C 7% CO₂ 培育箱中。在 125 mL 震盪燒瓶中使細胞繁殖至 40 mL。當細胞密度達到 1.5-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 100 mL 培養體積繁殖至 125 mL 旋轉式燒瓶中。將燒瓶在 37°C、7%CO₂ 下培育。當細胞密度達到 1.5-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 200 mL 培養體積繁殖至 250 mL 旋轉式燒瓶中，且將燒瓶在 37°C、7% CO₂ 下培育。當細胞密度達到 1.5-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 800 mL 培養體積繁殖至 1 L 旋轉式燒瓶中，且培育於 37°C、7%CO₂ 下。當細胞密度達到 1.5-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 5 L 培養體積繁殖至 6 L 旋轉式燒瓶中，且培育於 37°C、7%CO₂ 下。當細胞密度達到 1.5-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 20 L 培養體積繁殖至 36 L 旋轉式燒瓶中，且培育於 37°C、7%CO₂ 下。

在 121°C、20 PSI 下用蒸汽對 125 L 反應器進行滅菌且添加 65 L CD CHO 培養基。使用前，針對污染檢查反應器。當 36 L 旋轉式燒瓶中之細胞密度達到 1.8-2.5×10⁶ 個細胞/毫升時，將細胞培養物自 36 L 旋轉式燒瓶轉移至 125 L 生物反應器 (Braun) 中，得到 85 L 之最終體積及約 4×10⁵ 個細胞/毫升之接種密度。參數為溫度設定點：37°C；pH：7.2；溶氧：25%±10%；轉子速度：50 rpm；容器壓力：3 psi；空氣噴射：1 L/min.；空氣覆蓋：1 L/min。每日對反應器採樣以用於細胞計數、pH 核對、培養基分析、蛋白質製備及

留存。在進行期間添加營養補料。第 6 天，添加 3.4 L 1 號補料培養基（CD CHO+50 g/L 葡萄糖 +40 mL/L GlutaMAX™-1），且將培養溫度變為 36.5°C。第 9 天，添加 3.5 L 2 號補料（CD CHO + 50 g/L 葡萄糖 +40 mL/L GlutaMAX™-1+1.1 g/L 丁酸鈉）且將培養溫度變為 36°C。第 11 天，添加 3.7 L 3 號補料（CD CHO+50 g/L 葡萄糖 + 40 mL/L GlutaMAX™-1+1.1 g/L 丁酸鈉）且將培養溫度變為 35.5°C。第 14 天或當細胞活力降低於 50%時，收集反應器。該製程以 8 百萬個細胞/毫升之最大細胞密度產生酶活性為 1600 單位/毫升之可溶性 rHuPH20。收集時，對培養物採樣以檢驗試管內及活體內支原體、生物負荷、內毒素及病毒、病毒粒子之透射電子顯微（TEM）及酶活性。

將 100 公升生物反應器細胞培養收集物經由一系列具有聚醚砜介質之膠囊式過濾器（Sartorius）過濾：首先經由 8.0 μm 深度之膠囊、0.65 μm 深度之膠囊、0.22 μm 膠囊且最終經由 0.22 μm Sartopore 2000 cm² 過濾器過濾，且進入 100 L 無菌儲存袋中。使用具有螺旋聚醚砜 30 kDa MWCO 過濾器（Millipore）之兩個 TFF 將培養物濃縮成 10×，繼而與 10 mM HEPES、25 mM Na₂SO₄（pH=7.0）進行 6×緩衝液交換，經 0.22 μm 最終過濾器過濾至 20 L 無菌儲存袋中。表 11 提供與細胞培養、收集、濃縮及緩衝液交換步驟有關之監測資料。

表 11.細胞培養、收集、濃縮及緩衝液交換步驟之監測

資料

| 參數 | HUA0406C | HUA04010C | HUA0415C | HUA0420C |
|------------------------------------|----------|-----------|----------|----------|
| 自融化至接種於 100 L 生物反應器中之時間 (天) | 21 | 19 | 17 | 18 |
| 100 L 接種密度 ($\times 10^6$ 個細胞/毫升) | 0.45 | 0.33 | 0.44 | 0.46 |
| 指數生長之倍增時間 (hr) | 29.8 | 27.3 | 29.2 | 23.5 |
| 最大細胞密度 ($\times 10^6$ 個細胞/毫升) | 5.65 | 8.70 | 6.07 | 9.70 |
| 收集物活力 (%) | 41 | 48 | 41 | 41 |
| 收集物力價 (U/ml) | 1964 | 1670 | 991 | 1319 |
| 於 100 L 生物反應器中之時間 (天) | 13 | 13 | 12 | 13 |
| 經淨化之收集物體積 (mL) | 81800 | 93300 | 91800 | 89100 |
| 經淨化之收集物酶檢定 (U/mL) | 2385 | 1768 | 1039 | 1425 |
| 濃縮物酶檢定 (U/mL) | 22954 | 17091 | 8561 | 17785 |
| 經緩衝液交換之濃縮物酶檢定 (U/mL) | 15829 | 11649 | 9915 | 8679 |
| 經過濾之經緩衝液交換之濃縮物酶檢定 (U/mL) | 21550 | 10882 | 9471 | 8527 |
| 經緩衝液交換之濃縮物體積 (mL) | 10699 | 13578 | 12727 | 20500 |
| 酶單位濃度/收集物之比率 | 0.87 | 0.96 | 1.32 | 1.4 |

製備 Q 瓊脂糖 (Pharmacia) 離子交換管柱 (3 L 樹脂, 高度=20 cm, 直徑=14 cm)。收集沖洗樣品以測定 pH、傳導性及內毒素 (LAL) 檢定。管柱係用 5 倍管柱體積之 10 mM Tris、20 mM Na_2SO_4 (pH=7.5) 來平衡。以 100 cm/hr 之流速將經濃縮之經透濾之收集物負載於 Q 管柱上。用 5 倍管柱體積之 10 mM Tris、20 mM Na_2SO_4 (pH=7.5) 及 10 mM HEPES、50 mM NaCl (pH=7.0) 來洗滌管柱。用 10 mM HEPES、400 mM NaCl (pH=7.0) 來溶離蛋白質且經由 0.22 μm

最終過濾器過濾至無菌袋中。

接著進行苯基瓊脂糖 (Pharmacia) 疏水性相互作用層析。製備苯基瓊脂糖 (PS) 管柱 (9.1 L 樹脂, 高度=29 cm, 直徑=20 cm)。用 5 倍管柱體積之 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨、0.1 mM CaCl_2 (pH=7.0) 來平衡管柱。向來自上文之蛋白質溶離液中補充 2 M 硫酸銨、1 M 磷酸鉀及 1 M CaCl_2 儲備溶液直至分別得到 5 mM 硫酸銨、0.5 M 磷酸鉀及 0.1 mM CaCl_2 之最終濃度。以 100 cm/hr 之流速將蛋白質負載於 PS 管柱上。以 100 cm/hr 添加 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨及 0.1 mM CaCl_2 (pH=7.0)。經由 0.22 μm 最終過濾器通過而流入無菌袋中。

將經 PS 純化之蛋白質負載於胺基苯基酉朋酸酯管柱 (ProMedics) (6.3 L 樹脂, 高度=20 cm, 直徑=20 cm) 上, 該管柱已用 5 倍管柱體積之 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨來平衡。蛋白質以 100 cm/hr 之流速通過管柱, 且用 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨 (pH=7.0) 來洗滌管柱。接著用 20 mM N-二甘胺酸、100 mM NaCl (pH=9.0) 來洗滌管柱且用 50 mM HEPES、100 mM NaCl (pH=6.9) 來溶離蛋白質, 經由無菌過濾器且進入 20 L 無菌袋中。測試溶離液之生物負荷、蛋白質濃度及酶活性。

用 5 mM 磷酸鉀、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 (pH=7.0) 來平衡羥基磷灰石 (HAP) 管柱 (BioRad) (1.6 L 樹脂, 高度=10 cm, 直徑=14 cm)。收集沖洗樣品且測試 pH、傳導性及內毒素 (LAL 檢定)。向經胺基苯基酉朋酸酯純化之蛋

白質中補充磷酸鉀及 CaCl_2 以得到 5 mM 磷酸鉀及 0.1 mM CaCl_2 之最終濃度，且以 100 cm/hr 之流速負載於 HAP 管柱上。用 5 mM 磷酸鉀 (pH=7.0)、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 ，接著 10 mM 磷酸鉀 (pH=7.0)、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 來洗滌管柱。用 70 mM 磷酸鉀 (pH=7.0) 溶離蛋白質且經由 0.22 μm 過濾器過濾至 5 L 無菌儲存袋中。測試溶離液之生物負荷、蛋白質濃度及酶活性。

接著經由壓力槽抽汲經 HAP 純化之蛋白質而經過 20 nM 病毒移除過濾器。將蛋白質添加至 DV20 壓力槽及過濾器 (Pall 公司) 中，通過具有 20 nm 微孔之 Ultipor DV20 過濾器 (Pall 公司) 而進入無菌 20 L 儲存袋中。測試濾液之蛋白質濃度、酶活性、寡糖、單糖及唾液酸分布及製程相關雜質。接著使用 10 kD 分子量截斷 (MWCO) Sartocn Slice 切向流過濾 (TFF) 系統 (Sartorius) 將濾液中之蛋白質濃縮至 1 mg/mL。首先藉由用 Hepes/鹽水溶液 (10 mM Hepes, 130 mM NaCl, pH=7.0) 洗滌來使過濾器作準備且對滲透物採樣以檢測 pH 及傳導性。濃縮後，對經濃縮之蛋白質採樣且測試蛋白質濃度及酶活性。對經濃縮之蛋白質進行 6×緩衝液交換而使其處於最終緩衝液 (10 mM Hepes, 130 mM NaCl, pH7.0) 中。使經濃縮之蛋白質通過 0.22 μm 過濾器而進入 20 L 無菌儲存袋中。對蛋白質採樣且測試蛋白質濃度、酶活性、自由硫氫基、寡糖分布及容積滲透濃度。

表 12 至 18 提供每一 3D35M 細胞批次之與上文所述之

純化步驟中之每一者有關之監測資料。

表 12.Q 瓊脂糖管柱資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 負載體積 (mL) | 10647 | 13524 | 12852 | 20418 |
| 負載體積/樹脂體積比 | 3.1 | 4.9 | 4.5 | 7.3 |
| 管柱容積 (mL) | 2770 | 3840 | 2850 | 2880 |
| 溶離液體積 (mL) | 6108 | 5923 | 5759 | 6284 |
| 溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 2.8 | 3.05 | 2.80 | 2.86 |
| 溶離液酶檢定 (U/mL) | 24493 | 26683 | 18321 | 21052 |
| 酶產率 (%) | 65 | 107 | 87 | 76 |

表 13. 苯基瓊脂糖管柱資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 添加儲備溶液之前的體積 (mL) | 5670 | 5015 | 5694 | 6251 |
| 負載體積 (mL) | 7599 | 6693 | 7631 | 8360 |
| 管柱容積 (mL) | 9106 | 9420 | 9340 | 9420 |
| 負載體積/樹脂體積比 | 0.8 | 0.71 | 0.82 | 0.89 |
| 溶離液體積 (mL) | 16144 | 18010 | 16960 | 17328 |
| 溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 0.4 | 0.33 | 0.33 | 0.38 |
| 溶離液酶檢定 (U/mL) | 8806 | 6585 | 4472 | 7509 |
| 蛋白質產率 (%) | 41 | 40 | 36 | 37 |
| 酶產率 (%) | 102 | 88 | 82 | 96 |

表 14. 胺基苯基酉朋酸酯管柱資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| 負載體積 (mL) | 16136 | 17958 | 16931 | 17884 |
| 負載體積/樹脂體積比 | 2.99 | 3.15 | 3.08 | 2.98 |
| 管柱容積 (mL) | 5400 | 5700 | 5500 | 5300 |
| 溶離液體積 (mL) | 17595 | 22084 | 20686 | 19145 |
| 溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 0.0 | 0.03 | 0.03 | 0.04 |
| 經過濾之溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 未測試 | 0.03 | 0.00 | 0.04 |
| 溶離液酶檢定 (U/mL) | 4050 | 2410 | 1523 | 4721 |
| 蛋白質產率 (%) | 0 | 11 | 11 | 12 |
| 酶產率 (%) | 未測定 | 41 | 40 | 69 |

表 15. 羧基磷灰石管柱資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| 添加儲備溶液之前的體積 (mL) | 16345 | 20799 | 20640 | 19103 |
| 負載體積/樹脂體積比 | 10.95 | 13.58 | 14.19 | 12.81 |
| 管柱容積 (mL) | 1500 | 1540 | 1462 | 1500 |
| 負載體積 (mL) | 16429 | 20917 | 20746 | 19213 |
| 溶離液體積 (mL) | 4100 | 2415 | 1936 | 2419 |
| 溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 未測試 | 0.24 | 0.17 | 0.23 |
| 經過濾之溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 無 | 無 | 0.17 | 無 |
| 溶離液酶檢定 (U/mL) | 14051 | 29089 | 20424 | 29826 |
| 蛋白質產率 (%) | 未測試 | 93 | 53 | 73 |
| 酶產率 (%) | 87 | 118 | 140 | 104 |

表 16. DV20 過濾資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| 開始體積 (mL) | 4077 | 2233 | 1917 | 2419 |
| 濾液體積 (mL) | 4602 | 3334 | 2963 | 3504 |
| 濾液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 0.1 | 無 | 0.09 | 無 |
| 經過濾之溶離液之蛋白質濃度 (mg/mL) | 無 | 0.15 | 0.09 | 0.16 |
| 蛋白質產率 (%) | 未測試 | 93 | 82 | 101 |

表 17. 最終濃度資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 開始體積 (mL) | 4575 | 3298 | 2963 | 3492 |
| 濃縮物體積 (mL) | 562 | 407 | 237 | 316 |
| 濃縮物之蛋白質濃度 (mg/mL) | 0.9 | 1.24 | 1.16 | 1.73 |
| 蛋白質產率 (%) | 111 | 102 | 103 | 98 |

表 18. 緩衝液交換成最終調配物之資料

| 參數 | HUA0406C | HUA0410C | HUA0415C | HUA0420C |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| 開始體積 (mL) | 562 | 407 | 237 | 316 |
| 經緩衝液交換之濃縮物之最終體積 (mL) | 594 | 516 | 310 | 554 |
| 濃縮物之蛋白質濃度 (mg/mL) | 1.00 | 0.97 | 0.98 | 1.00 |
| 經過濾之濃縮物之蛋白質濃度 (mg/mL) | 0.95 | 0.92 | 0.95 | 1.02 |
| 蛋白質產率 (%) | 118 | 99 | 110 | 101 |

將經純化及濃縮之可溶性 rHuPH20 蛋白質無菌填充至具有 5 mL 及 1 mL 填充體積之無菌瓶中。使蛋白質通過 0.22 μm 過濾器而到達操作者控制之泵，該泵使用重量讀出器而用於填充該等瓶。用塞子封閉該等小瓶且用捲拉蓋密封。視覺上檢查所封閉之小瓶之外來粒子且接著貼標籤。貼標籤後，藉由在液氮中浸泡不超過 1 分鐘而使小瓶急驟冷凍且在 $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 下儲存。

實施例 5

含有可溶性人類 PH20 (rHuPH20) 之 Gen2 細胞的產生

使實施例 2 中所述之 Gen1 3D35M 細胞系適應於較高甲胺喋呤含量以產生 2 代 (Gen2) 純系。將 3D35M 細胞自己形成之含甲胺喋呤之培養物接種至含有 4 mM GlutaMAX-1™ 及 1.0 μM 甲胺喋呤之 CD CHO 培養基中。藉由使細胞在 37°C、7% CO_2 加濕培育箱中經 46 天之時段生長且續代 9 次而使細胞適應於較高甲胺喋呤含量。在容納具有 2.0 μM 甲胺喋呤之培養基的 96 孔組織培養板中藉由限

制稀釋而選殖出擴增之細胞群體。約 4 週後，識別純系且選擇純系 3E10B 以供繁殖。使 3E10B 細胞在含有 4 mM GlutaMAX-1™及 2.0 μ M 甲胺喋呤之 CD CHO 培養基中生長 20 代。形成 3E10B 細胞系之主細胞庫 (MCB) 且冷凍且用於後繼研究。

藉由將 3E10B 細胞培養於含有 4 mM GlutaMAX-1™及 4.0 μ M 甲胺喋呤之 CD CHO 培養基中而使細胞系繼續擴增。第 12 代後，將細胞在小瓶中冷凍以作為研究細胞庫 (RCB)。將一小瓶 RCB 融化且培養於含有 8.0 μ M 甲胺喋呤之培養基中。5 天後，培養基中之甲胺喋呤濃度增加至 16.0 μ M，接著在 18 天後增加至 20.0 μ M。在容納含有 4 mM GlutaMAX-1™及 20.0 μ M 甲胺喋呤之 CD CHO 培養基之 96 孔組織培養板中藉由限制稀釋而選殖出處於含有 20.0 μ M 甲胺喋呤之培養基中之第 8 代細胞。5-6 週後識別純系且選擇純系 2B2 以供在含有 20.0 μ M 甲胺喋呤之培養基中繁殖。第 11 代後，將 2B2 細胞在小瓶中冷凍以作為研究細胞庫 (RCB)。

所得 2B2 細胞為二氫葉酸還原酶缺乏之 (dhfr-) DG44 CHO 細胞，其表現可溶性重組人類 PH20 (rHuPH20)。可溶性 PH20 係以約 206 個複本/細胞之複本數存在於 2B2 細胞中。使用 rHuPH20 特異性探針對 Spe I-、Xba I-及 BamH I/Hind III-消化之基因組 2B2 細胞 DNA 之南方墨點分析揭示下列限制性消化特徵：在用 Spe I 消化 DNA 之情況下，1 條約 7.7 kb 之較大雜交條帶及 4 條較小雜交條帶 (約 13.9

kb、約 6.6 kb、約 5.7 kb 及約 4.6 kb); 在用 Xba I 消化 DNA 之情況下, 1 條約 5.0 kb 之較大雜交條帶及 2 條較小雜交條帶 (約 13.9 kb 及約 6.5 kb); 及使用由 BamH I/Hind III 消化之 2B2 DNA, 所觀察到之 1 條約 1.4 kb 之單一雜交條帶。mRNA 轉錄物之序列分析指示除 1131 位置處之一個鹼基對差異以外所衍生之 cDNA (SEQ ID NO:56) 與參照序列 (SEQ ID NO:49) 一致, 該鹼基對差異經觀察為胸苷 (T) 代替預期之胞嘧啶 (C)。此為沉默突變, 而不影響胺基酸序列。

實施例 6

A. Gen2 可溶性 rHuPH20 於 300 L 生物反應器細胞培養物中之產生

使一小瓶 HZ24-2B2 融化且自震盪燒瓶經由 36 L 旋轉式燒瓶於補充有 20 μ M 甲胺喋呤及 GlutaMAX-1™ (Invitrogen) 之 CD-CHO 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中繁殖。簡而言之, 在 37°C 水浴槽中使一小瓶細胞融化, 添加培養基且將細胞離心。在 125 mL 震盪燒瓶中用 20 mL 新鮮培養基使細胞再懸浮且置放於 37°C、7% 培育箱中。使細胞在 125 mL 震盪燒瓶中繁殖至 40 mL。當細胞密度達到大於 1.5×10^6 個細胞/mL 時, 使培養物以 100 mL 培養體積繁殖至 125 mL 旋轉式燒瓶中。在 37°C、7% CO₂ 下培育燒瓶。當細胞密度達到大於 1.5×10^6 個細胞/毫升時, 使培養物以 200 mL 培養體積繁殖至 250 mL 旋轉式燒瓶中, 且在 37°C、7% CO₂ 下培育燒瓶。當細胞密度達到大於 1.5×10^6 個細胞/毫升時, 使培養物以 800 mL 培養體積繁殖至 1 L 旋

轉式燒瓶中，且培育於 37°C、7% CO₂ 下。當細胞密度到達大於 1.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 5000 mL 培養體積繁殖至 6 L 旋轉式燒瓶中且培育於 37°C、7% CO₂ 下。當細胞密度到達大於 1.5×10⁶ 個細胞/毫升時，使培養物以 32 L 培養體積繁殖至 36 L 旋轉式燒瓶中且培育於 37°C、7% CO₂ 下。

對 400 L 反應器進行滅菌且添加 230 mL CD-CHO 培養基。使用前，針對污染檢查反應器。將約 30 L 細胞以每毫升 4.0×10⁵ 個活細胞之接種密度及 260 L 之總體積自 36 L 旋轉式燒瓶轉移至 400 L 生物反應器 (Braun) 中。參數為溫度設定點：37°C；轉子速度：40 RPM-55 RPM；容器壓力：3 psi；空氣噴射：0.5 L/Min.-1.5 L/Min.；空氣覆蓋：3 L/min.。每日對反應器採樣以用於細胞計數、pH 核對、培養基分析、蛋白質製備及留存。同樣，在進行期間，添加營養補料。第 120 小時 (第 5 天)，添加 10.4 L 1 號補料培養基 (4×CD-CHO+33 g/L 葡萄糖 +160 mL/L Glutamax-1™+83 mL/L 酵母自溶液 (Yeastolate) +33 mg/L 重組人類胰島素 (rHuInsulin))。第 168 小時 (第 7 天)，添加 10.8 L 2 號補料 (2×CD-CHO+33 g/L 葡萄糖+80 mL/L Glutamax-1™+167 mL/L 酵母自溶液+0.92 g/L 丁酸鈉) 且將培養溫度變為 36.5°C。第 216 小時 (第 9 天)，添加 10.8 L 3 號補料 (1×CD-CHO+50 g/L 葡萄糖 +50 mL/L Glutamax-1™+250 mL/L 酵母自溶液+1.80 g/L 丁酸鈉)，且將培養溫度變為 36°C。第 264 小時 (第 11 天)，添加 10.8 L

4 號補料 ($1 \times \text{CD-CHO} + 33 \text{ g/L}$ 葡萄糖 $+ 33 \text{ mL/L}$ Glutamax-1™ $+ 250 \text{ mL/L}$ 酵母自溶液 $+ 0.92 \text{ g/L}$ 丁酸鈉)，且將培養溫度變為 35.5°C 。在最終製備階段，觀察到添加補料培養基顯著增強可溶性 rHuPH20 之產生。第 14 天或 15 天或當細胞活力降低於 40% 時，收集反應器。該製程以 12 百萬個細胞/毫升之最大細胞密度得到每毫升 17,000 單位之最終生產率。收集時，自培養物採樣以檢驗試管內及活體內支原體、生物負荷、內毒素及病毒、透射電子顯微 (TEM) 及酶活性。

藉由蠕動泵抽汲培養物而通過 4 個並聯之 Millistak 過濾系統模組 (Millipore) (每一者含有一層屬於 $4 \mu\text{m} - 8 \mu\text{m}$ 等級之矽藻土及一層屬於 $1.4 \mu\text{m} - 1.1 \mu\text{m}$ 等級之矽藻土，繼之以纖維素膜) 接著通過含有一層屬於 $0.4 \mu\text{m} - 0.11 \mu\text{m}$ 等級之矽藻土及一層屬於 $< 0.1 \mu\text{m}$ 等級之矽藻土，繼之以纖維素膜之第二單個 Millistak 過濾系統 (Millipore)，且接著通過 $0.22 \mu\text{m}$ 最終過濾器而進入具有 350 L 容量之無菌一次性可撓性袋中。用 10 mM EDTA 及 10 mM Tris 補充所收集之細胞培養物直至 pH 為 7.5。用使用 4 個 Sartoslice TFF 30 kDa 分子量截斷 (MWCO) 聚醚砜 (PES) 過濾器 (Sartorius) 之切向流過濾 (TFF) 設備將培養物濃縮成 $10\times$ ，繼而與 10 mM Tris、20 mM Na_2SO_4 (pH=7.5) 進行 $10\times$ 緩衝液交換，經由 $0.22 \mu\text{m}$ 最終過濾器而進入 50 L 無菌儲存袋中。

使經濃縮、經透濾之收集物之病毒滅活。在病毒滅活之前，製備 10% Triton X-100、3% 三(正丁基)磷酸酯 (TNBP)

之溶液。在經 Q 管柱純化前立即使經濃縮、經透濾之收集物在 36 L 玻璃反應容器中暴露於 1% Triton X-100、0.3% TNBP，歷時 1 小時。

B. Gen2 可溶性 rHuPH20 之純化

製備 Q 瓊脂糖 (Pharmacia) 離子交換管柱 (9 L 樹脂, H=29 cm, D=20 cm)。收集沖洗樣品以測定 pH、傳導性及內毒素 (LAL) 檢定。管柱用 5 倍管柱體積之 10 mM Tris、20 mM Na₂SO₄ (pH=7.5) 來平衡。病毒滅活後，以 100 cm/hr 之流速將經濃縮透濾之收集物負載於 Q 管柱上。用 5 倍管柱容積之 10 mM Tris、20 mM Na₂SO₄ (pH=7.5) 及 10 mM Hepes、50 mM NaCl (pH=7.0) 洗滌管柱。用 10 mM Hepes、400 mM NaCl (pH=7.0) 溶離蛋白質，經由 0.22 μm 最終過濾器而進入無菌袋中。測試溶離液樣品之生物負荷、蛋白質濃度及玻尿酸酶活性。在交換開始及結束時獲得 A₂₈₀ 吸光度讀數。

接著進行苯基瓊脂糖 (Pharmacia) 疏水性相互作用層析。製備苯基瓊脂糖 (PS) 管柱 (19 L-21 L 樹脂, H=29 cm, D=30 cm)。收集沖洗液且採樣以檢驗 pH、傳導性及內毒素 (LAL 檢定)。用 5 倍管柱體積之 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨、0.1 mM CaCl₂ (pH=7.0) 來平衡管柱。向來自 Q 瓊脂糖管柱之蛋白質溶離液中補充 2 M 硫酸銨、1 M 磷酸鉀及 1 M CaCl₂ 儲備溶液以分別得到 5 mM 硫酸銨、0.5 M 磷酸鉀及 0.1 mM CaCl₂ 之最終濃度。以 100 cm/hr 之流速將蛋白質負載於 PS 管柱上且收集經過管柱之流。以 100 cm/hr 用

5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨及 0.1 mM CaCl_2 (pH=7.0) 洗滌管柱且將洗滌液添加至所收集之經過流中。將經過流與管柱洗滌液組合，通過 0.22 μm 最終過濾器而進入無菌袋中。對經過流採樣以檢驗生物負荷、蛋白質濃度及酶活性。

製備胺基苯基酉朋酸酯 (Promtics) 管柱。收集洗滌液且採樣以檢驗 pH、傳導性及內毒素 (LAL 檢定)。用 5 倍管柱體積之 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨平衡管柱。將含有經純化之蛋白質之 PS 經過流以 100 cm/hr 之流速負載於胺基苯基酉朋酸酯管柱上。用 5 mM 磷酸鉀、0.5 M 硫酸銨 (pH=7.0) 洗滌管柱。用 20 mM N-二甘胺酸、0.5 M 硫酸銨 (pH=9.0) 洗滌管柱。用 20 mM N-二甘胺酸、100 mM 氯化鈉 (pH=9.0) 洗滌管柱。用 50 mM HEPES、100 mM NaCl (pH=6.9) 溶離蛋白質且通過無菌過濾器而進入無菌袋中。測試所溶離樣品之生物負荷、蛋白質濃度及酶活性。

製備羥基磷灰石 (HAP) 管柱 (Biorad)。收集洗滌液且測試 pH、傳導性及內毒素 (LAL 檢定)。用 5 mM 磷酸鉀、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 (pH=7.0) 平衡管柱。將經胺基苯基酉朋酸酯純化之蛋白質補充至 5 mM 磷酸鉀及 0.1 mM CaCl_2 之最終濃度，且以 100 cm/hr 之流速負載於 HAP 管柱上。用 5 mM 磷酸鉀 (pH=7.0)、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 洗滌管柱。其次用 10 mM 磷酸鉀 (pH=7.0)、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 洗滌管柱。用 70 mM 磷酸鉀 (pH=7.0) 溶離蛋白質且通過 0.22 μm 無菌過濾器而進入無菌袋中。測試所溶離樣品之生物負荷、蛋白質濃度及酶活性。

接著使經 HAP 純化之蛋白質通過病毒移除過濾器。首先藉由用 2 L 70 mM 磷酸鉀 (pH=7.0) 洗滌來使經滅菌之 Viosart 過濾器 (Sartorius) 作準備。使用前，對經過濾之緩衝液採樣以檢驗 pH 及傳導性。經由蠕動泵抽汲經 HAP 純化之蛋白質而經過 20 nM 病毒移除過濾器。使 70 mM 磷酸鉀 (pH=7.0) 中之經過濾蛋白質通過 0.22 μm 最終過濾器而進入無菌袋中。測試經病毒過濾之樣品之蛋白質濃度、酶活性、寡糖、單糖及唾液酸分布。亦測試樣品之製程相關雜質。

接著使用 10 kD 分子量截斷 (MWCO) Sartocn Slice 切向流過濾 (TFF) 系統 (Sartorius) 將濾液中之蛋白質濃縮至 10 mg/mL。首先藉由用 10 mM 組胺酸、130 mM NaCl (pH=6.0) 洗滌來使過濾器作準備且對滲透物採樣以檢測 pH 及傳導性。濃縮後，對經濃縮之蛋白質採樣且測試蛋白質濃度及酶活性。對經濃縮之蛋白質進行 6 \times 緩衝液交換而使其處於最終緩衝液：10 mM 組胺酸、130 mM NaCl (pH=6.0) 中。緩衝液交換後，使經濃縮之蛋白質通過 0.22 μm 過濾器而進入 20 L 無菌儲存袋中。對蛋白質採樣且測試蛋白質濃度、酶活性、自由硫氫基、寡糖分布及容積滲透濃度。

接著將無菌經過濾之主體蛋白質以 20 mL 無菌分配於 30 mL 無菌鐵氟龍小瓶 (Nalgene) 中。接著使小瓶急驟冷凍且在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

C. Gen1 可溶性 rHuPH20 與 Gen2 可溶性 rHuPH20

之製備及純化比較

與 Gen1 可溶性 rHuPH20 於 100 L 生物反應器細胞培養物中之製備及純化（實施例 4.B 中所述）相比，Gen2 可溶性 rHuPH20 於 300 L 生物反應器細胞培養物中之製備及純化的方案含有一些變化。表 19 闡明該等方法之間的除簡單按比例放大變化以外之例示性差異。

| 表 19 | | |
|-----------------|---|---|
| 製程差異 | Gen1 可溶性 rHuPH20 | Gen2 可溶性 rHuPH20 |
| 細胞系 | 3D35M | 2B2 |
| 用於擴增細胞接種體之培養基 | 含有 0.10 μ M 甲胺喋呤 (0.045 mg/L) | 含有 20 μ M 甲胺喋呤 (9 mg/L) |
| 先前 6 L 培養物中之培養基 | 含有 0.10 μ M 甲胺喋呤 | 不含甲胺喋呤 |
| 36 L 旋轉式燒瓶 | 無儀器裝備 20 L 操作體積 | 裝備有監測及控制 pH、溶氧、噴射及覆蓋氣體流速之儀器裝備。 32 L 操作體積 |
| 生物反應器中之最終操作體積 | 125 L 生物反應器中之約 100 L (初始培養體積+65 L) | 400 L 生物反應器中之約 300 L (初始培養體積+260 L) |
| 最終生物反應器中之培養基 | 無重組人類胰島素 | 5.0 mg/L 重組人類胰島素 |
| 培養基補料體積 | 規模為生物反應器細胞培養物體積之 4%，亦即 3.4 L、3.5 L 及 3.7 L，得到約 92 L 之目標生物反應器體積。 | 規模為生物反應器細胞培養物體積之 4%，亦即 10.4 L、10.8 L、11.2 L 及 11.7 L，得到約 303 L 之目標生物反應器體積。 |
| 培養基補料 | 1 號補料培養基：CD CHO+50 g/L 葡萄糖+8 mM GlutaMAX™-1 2 號補料 (CD CHO+50 g/L 葡萄糖 +8 mM GlutaMAX+1.1 g/L 丁酸鈉) 3 號補料：CD CHO+50 g/L 葡萄糖 +8 mM GlutaMAX+1.1 g/L 丁酸鈉 | 1 號補料培養基：4×CD CHO+33 g/L 葡萄糖+32 mM Glutamax+16.6 g/L 酵母自溶液+33 mg/L 重組人類胰島素 2 號補料：2×CD CHO+33 g/L 葡萄糖+16 mM Glutamax+33.4 g/L 酵母自溶液+0.92 g/L 丁酸鈉 3 號補料：1×CD CHO+50 g/L 葡萄糖+10 mM Glutamax+50 g/L 酵母自溶液+1.80 g/L 丁酸鈉 4 號補料：1×CD CHO+33 g/L 葡萄糖 |

| | | |
|-------------------|---|---|
| | | +6.6 mM Glutamax+50 g/L 酵母自溶液 +0.92 g/L 丁酸鈉 |
| 生物反應器細胞 培養物之過濾 | 串聯之 4 個聚醚砜過濾器 (8.0 μm 、0.65 μm 、0.22 μm 及 0.22 μm) 100 L 儲存袋 | 第一階段-並聯之 4 個模組，每一者具有一層屬於 4 μm -8 μm 等級之矽藻土及一層屬於 1.4 μm -1.1 μm 等級之矽藻土，繼之以纖維素膜。 第二階段-單個模組，其含有一層屬於 0.4 μm -0.11 μm 等級之矽藻土及一層屬於 <0.1 μm 等級之矽藻土，繼之以纖維素膜。 第三階段-0.22 μm 聚醚砜過濾器 300 L 儲存袋 用 10 mM EDTA、10 mM Tris 補充所收集之細胞培養物以使 pH 達到 7.5。 |
| 層析前濃縮及緩衝液交換 | 用具有 Millipore 螺旋聚醚砜 30K MWCO 過濾器之 2 個 TFF 濃縮 用 10 mM HEPES、25 mM NaCl (pH=7.0) 與 6 \times 濃縮物緩衝液交換 20 L 無菌儲存袋 | 使用 4 個 Sartorius Sartoslice TFF 30K MWCO 過濾器濃縮 用 10 mM Tris、20 mM Na ₂ SO ₄ (pH=7.5) 與 10 \times 濃縮物緩衝液交換 50 L 無菌儲存袋 |
| 層析前病毒滅活 | 無 | 藉由添加 1% Triton X-100、0.3% 磷酸三丁酯 (pH=7.5) 來進行病毒滅活 |
| 第一純化步驟 (Q 瓊脂糖) | 無吸光度讀數 | 在開始及結束時 A280 量測 |
| 層析後病毒過濾 | Pall DV-20 過濾器 (20 nm) | Sartorius Virosart 過濾器 (20 nm) |
| 層析後濃縮及緩衝液交換 | HEPES/鹽水緩衝液 (pH=7.0) 蛋白質濃縮至 1 mg/ml | 組胺酸/鹽水緩衝液 (pH=6.0) 蛋白質濃縮至 10 mg/ml |

因為修改對於熟習此項技術者而言為顯而易見的，所以本發明意欲僅受隨附之申請專利範圍之範疇所限制。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 巴克斯特保健公司
 巴克斯特國際公司
 哈羅賽公司
 理查 史夫
 赫恩斯 雷柏
 葛傑瑞 芙羅斯

<120> 供免疫球蛋白及玻尿酸酶之皮下投藥之用的組合及方法

<130> 0119374-00114/3058TW

<140> 尚未指定

<141> 同此

<150> US 61/069,841

<151> 2008-03-17

<160> 56

<170> 適用Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> 智慧人

<220>

<223> 前驅人類PH20

<400> 1

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

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

<210> 2
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 成熟PH20

<400> 2
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110
 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140
 Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys Leu Leu Arg
 165 170 175
 Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His
 180 185 190
 His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn Val Glu Ile
 195 200 205
 Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser Thr Ala Leu
 210 215 220
 Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val Ser Lys Ile
 245 250 255
 Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr Arg Ile Val
 260 265 270
 Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu Leu Val Tyr
 275 280 285
 Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Val Ile Trp
 290 295 300
 Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 325 330 335
 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 340 345 350



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

<210> 3
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 前驅可溶性rHuPH20

<400> 3
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys Ile Asp Ala
 420 425 430
 Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile Phe Tyr
 435 440 445

<210> 5
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 可溶性rHuPH20 1-446

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

<210> 6
 <211> 445
 <212> PRT

<213> 智慧人

<220>

<223> 可溶性rHuPH20 1-445

<400> 6

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

<210> 7

<211> 444

<212> PRT

<213> 智慧人

<220>

<223> 可溶性rHuPH20 1-444

<400> 7

Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro

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

<210> 8
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 可溶性rHuPH20 1-443

<400> 8
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 可溶性rHuPH20 1-442

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



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

<210> 10
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 歐洲牛 (Bos taurus)

<220>
 <223> 玻尿酸酶

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

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

<210> 11
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> 歐洲牛

<220>
 <223> PH20

<400> 11
 Met Arg Met Leu Arg Arg His His Ile Ser Phe Arg Ser Phe Ala Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Thr Pro Gln Ala Val Phe Thr Phe Leu Leu Leu Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Ala Leu Asp Phe Arg Ala Pro Pro Leu Ile Ser Asn Thr Ser
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Val Glu Arg Cys Val Asn Arg Arg
 50 55 60
 Phe Gln Leu Pro Pro Asp Leu Arg Leu Phe Ser Val Lys Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ser Ala Thr Gly Gln Phe Ile Thr Leu Phe Tyr Ala Asp Arg
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Tyr Pro His Ile Asp Glu Lys Thr Gly Lys Thr Val Phe
 100 105 110
 Gly Gly Ile Pro Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ser His Met Glu Lys Ala
 115 120 125
 Lys Asn Asp Ile Ala Tyr Tyr Ile Pro Asn Asp Ser Val Gly Leu Ala
 130 135 140
 Val Ile Asp Trp Glu Asn Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Gln Lys
 165 170 175
 Asn Pro Gln Leu Ser Phe Pro Glu Ala Ser Lys Ile Ala Lys Val Asp
 180 185 190
 Phe Glu Thr Ala Gly Lys Ser Phe Met Gln Glu Thr Leu Lys Leu Gly
 195 200 205
 Lys Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp
 210 215 220
 Cys Tyr Asn His Asn His Gln Pro Thr Tyr Asn Gly Asn Cys Pro
 225 230 235 240
 Asp Val Glu Lys Arg Arg Asn Asp Asp Leu Glu Trp Leu Trp Lys Glu
 245 250 255
 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asn Ile Arg Leu Lys Ser
 260 265 270
 Thr Gln Asn Ala Ala Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Gln Glu Ala Ile
 275 280 285
 Arg Leu Ser Lys Ile Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val



290 295 300
 Tyr Ala Arg Pro Val Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln
 305 310 315 320
 Gly Asp Leu Val Asn Ser Val Gly Glu Ile Val Ser Leu Gly Ala Ser
 325 330 335
 Gly Ile Ile Met Trp Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ser Met Gln Ser
 340 345 350
 Cys Met Asn Leu Gly Thr Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile
 355 360 365
 Ile Asn Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys His
 370 375 380
 Asn Glu Gly Val Cys Thr Arg Lys His Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu
 385 390 395 400
 His Leu Asn Pro Met Asn Phe Ala Ile Gln Thr Gly Glu Gly Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Thr Val Pro Gly Thr Val Thr Leu Glu Asp Leu Gln Lys Phe Ser
 420 425 430
 Asp Thr Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ala Asn Ile His Cys Lys Lys Arg
 435 440 445
 Val Asp Ile Lys Asn Val His Ser Val Asn Val Cys Met Ala Glu Asp
 450 455 460
 Ile Cys Ile Asp Ser Pro Val Lys Leu Gln Pro Ser Asp His Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Gln Glu Ala Ser Thr Thr Thr Phe Ser Ile Ser Pro Ser Thr
 485 490 495
 Thr Thr Ala Thr Val Ser Pro Cys Thr Pro Glu Lys His Ser Pro Glu
 500 505 510
 Cys Leu Lys Val Arg Cys Ser Glu Val Ile Pro Asn Val Thr Gln Lys
 515 520 525
 Ala Cys Gln Ser Val Lys Leu Lys Asn Ile Ser Tyr Gln Ser Pro Ile
 530 535 540
 Gln Asn Ile Lys Asn Gln Thr Thr Tyr
 545 550

<210> 12
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> 黄胡蜂 (*Vespula vulgaris*)

<220>
 <223> 玻尿酸酶A

<400> 12
 Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Met Cys His Gln Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe
 20 25 30
 Asn Ile Lys Arg Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ala
 35 40 45
 Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Ser Leu Lys Asp
 50 55 60
 Gly Lys Tyr Lys Lys Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Ile His Leu Gln Lys Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Asn Arg Asn Phe Ser Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg
 100 105 110
 Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Lys Ile His Lys Asn Phe
 115 120 125
 Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Thr Trp Asn Lys Lys Met
 130 135 140
 Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Phe Phe
 145 150 155 160
 Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp
 165 170 175
 Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn
 180 185 190
 Leu Val Pro Glu Cys Asp Val Thr Ala Met His Glu Asn Asp Lys Met
 195 200 205
 Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Val
 210 215 220
 Arg Gln Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Ile Gly Leu Val Gln Gly Arg
 225 230 235 240
 Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys
 245 250 255

Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Glu Thr Asn Thr Phe
 260 265 270
 Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Ile Asn
 275 280 285
 Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
 290 295 300
 Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Gln Asp Tyr Leu Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ile Ala Ile Asn Val Thr Glu Ala Val Asn
 325 330

<210> 13
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 黄胡蜂

<220>
 <223> 玻尿酸酶B

<400> 13
 Asp Arg Thr Ile Trp Pro Lys Lys Gly Phe Ser Ile Tyr Trp Asn Ile
 1 5 10 15
 Pro Thr His Phe Cys His Asn Phe Gly Val Tyr Phe Lys Glu Leu Lys
 20 25 30
 Gln Phe Asn Ile Lys Tyr Asn Ser Met Asn Asn Phe Arg Gly Glu Thr
 35 40 45
 Ile Ser Leu Phe Tyr Asp Pro Gly Asn Phe Pro Ser Met Val Leu Leu
 50 55 60
 Lys Asn Gly Thr Tyr Glu Ile Arg Asn Glu Gly Val Pro Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Asn Leu Thr Ile His Leu Glu Gln Phe Thr Lys Glu Leu Asp Glu Ile
 85 90 95
 Tyr Pro Lys Lys Ile Ala Gly Gly Ile Gly Val Ile His Phe His Asn
 100 105 110
 Trp Arg Pro Ile Phe Arg Arg Asn Val Asp Asn Leu Lys Ile Asn Lys
 115 120 125
 Asp Ile Ser Ile Asp Leu Val Arg Lys Glu His Pro Lys Trp Asp Lys
 130 135 140
 Ser Met Ile Glu Lys Glu Ala Ser Asn Arg Phe Glu Thr Ser Ala Lys
 145 150 155 160
 Ile Phe Met Glu Lys Thr Leu Lys Leu Ala Lys Glu Ile Arg Lys Lys
 165 170 175
 Thr Glu Trp Gly Tyr His Gly Tyr Pro His Cys Leu Ser Gly Ser Thr
 180 185 190
 Asp Lys Pro Ser Phe Asp Cys Asp Ala Leu Ser Met Ser Glu Asn Asp
 195 200 205
 Lys Met Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Ile
 210 215 220
 Tyr Leu Lys Asn Val Leu Lys Pro Asp Glu Lys Ile His Leu Val Gln
 225 230 235 240
 Glu Arg Leu Lys Glu Ala Ile Arg Ile Ser Lys Asn Phe Lys His Leu
 245 250 255
 Pro Lys Val Leu Pro Tyr Trp Trp Tyr Thr Tyr Gln Asp Lys Glu Ser
 260 265 270
 Ile Phe Leu Thr Glu Ala Asp Val Lys Asn Thr Phe Lys Glu Ile Leu
 275 280 285
 Thr Asn Gly Ala Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Val Ser Tyr Glu Leu
 290 295 300
 Thr Asp Arg Lys Arg Cys Glu Lys Leu Lys Glu Tyr Leu Met Lys Ile
 305 310 315 320
 Leu Gly Pro Ile Ala Phe Lys Val Thr Lys Ala Val Lys Glu Asn Thr
 325 330 335
 Pro Leu Asn Phe
 340

<210> 14
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 西方蜂 (Apis mellifera)

<220>
 <223> 玻尿酸酶

<400> 14



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

<210> 15

<211> 331

<212> PRT

<213> 白麵長黃胡蜂 (*Dolichovespula maculata*)

<220>

<223> 玻尿酸酶

<400> 15

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

130 135 140
 Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Phe
 145 150 155
 Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp
 165 170 175
 Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn
 180 185 190
 Leu Val Pro Asp Cys Asp Ala Thr Ala Met Leu Glu Asn Asp Lys Met
 195 200 205
 Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Ile
 210 215 220
 Arg His Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Val Gly Leu Val Gln Gly Arg
 225 230 235
 Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys
 245 250 255
 Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Asp Thr Asn Thr Phe
 260 265 270
 Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn
 275 280 285
 Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser
 290 295 300
 Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn 330
 325 330

<210> 16
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> 馬蜂 (Polistes annularis)

<220>
 <223> 玻尿酸酶

<400> 16
 Tyr Val Ser Leu Ser Pro Asp Ser Val Phe Asn Ile Ile Thr Asp Asp
 1 5 10 15
 Ile Ser His Gln Ile Leu Ser Arg Ser Asn Cys Glu Arg Ser Lys Arg
 20 25 30
 Pro Lys Arg Val Phe Ser Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr Phe Met Cys
 35 40 45
 His Gln Tyr Gly Met Asn Phe Asp Glu Val Thr Asp Phe Asn Ile Lys
 50 55 60
 His Asn Ser Lys Asp Asn Phe Arg Gly Glu Thr Ile Ser Ile Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Pro Gly Lys Phe Pro Ala Leu Met Pro Leu Lys Asn Gly Asn Tyr
 85 90 95
 Glu Glu Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Arg Gly Asn Ile Thr Ile His
 100 105 110
 Leu Gln Gln Phe Asn Glu Asp Leu Asp Lys Met Thr Pro Asp Lys Asn
 115 120 125
 Phe Gly Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Lys Pro Ile Phe
 130 135 140
 Arg Gln Asn Trp Gly Asn Thr Glu Ile His Lys Lys Tyr Ser Ile Glu
 145 150 155 160
 Leu Val Arg Lys Glu His Pro Lys Trp Ser Glu Ser Met Ile Glu Ala
 165 170 175
 Glu Ala Thr Lys Lys Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Tyr Phe Met Glu Glu
 180 185 190
 Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Arg Ala Lys Trp Gly Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Phe Pro Tyr Cys Tyr Asn Val Thr Pro Asn Asn Pro Gly Pro
 210 215 220
 Asp Cys Asp Ala Lys Ala Thr Ile Glu Asn Asp Arg Leu Ser Trp Met
 225 230 235 240
 Tyr Asn Asn Gln Glu Ile Leu Phe Pro Ser Val Tyr Val Arg His Glu
 245 250 255
 Gln Lys Pro Glu Glu Arg Val Tyr Leu Val Gln Gly Arg Ile Lys Glu
 260 265 270
 Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Glu His Ser Pro Ser Val Leu Ala
 275 280 285
 Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Lys Met Asp Ile Tyr Leu Ser Glu
 290 295 300
 Thr Asp Val Glu Lys Thr Phe Gln Glu Ile Val Thr Asn Gly Gly Asp
 305 310 315 320

Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser Leu Ser Lys
 325 330 335
 Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Gly Pro Phe Ala
 340 345 350
 Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn Gly Arg Ser Ser Leu Asn Phe
 355 360 365

<210> 17
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>
 <223> 玻尿酸酶

<400> 17
 Met Leu Gly Leu Thr Gln His Ala Gln Lys Val Trp Arg Met Lys Pro
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Glu Val Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ala Thr Ala Gly His
 20 25 30
 Leu Leu Arg Ile Ser Thr Leu Phe Leu Thr Leu Leu Glu Leu Ala Gln
 35 40 45
 Val Cys Arg Gly Ser Val Val Ser Asn Arg Pro Phe Ile Thr Val Trp
 50 55 60
 Asn Gly Asp Thr His Trp Cys Leu Thr Glu Tyr Gly Val Asp Val Asp
 65 70 75 80
 Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Lys Glu Gln Ser Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Asn Met Thr Ile Phe Tyr Arg Glu Glu Leu Gly Thr Tyr Pro Tyr
 100 105 110
 Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu Pro Gln Asn Ala
 115 120 125
 Ser Leu Val Thr His Leu Ala His Thr Phe Gln Asp Ile Lys Ala Ala
 130 135 140
 Met Pro Glu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Ala
 145 150 155 160
 Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Ser Lys Asp Ile Tyr Arg
 165 170 175
 Gln Arg Ser Met Glu Leu Val Gln Ala Glu His Pro Asp Trp Pro Glu
 180 185 190
 Thr Leu Val Glu Ala Ala Ala Lys Asn Gln Phe Gln Glu Ala Ala Glu
 195 200 205
 Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Val Leu Arg Pro Arg
 210 215 220
 Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr Asn Asn Asp Phe
 225 230 235 240
 Leu Ser Leu Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Val Phe Val Arg Asp Gln
 245 250 255
 Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Asn Gln Ser Tyr Ala Leu Tyr Pro
 260 265 270
 Ser Ile Tyr Leu Pro Ala Ala Leu Met Gly Thr Gly Lys Ser Gln Met
 275 280 285
 Tyr Val Arg His Arg Val Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala Ile Val Ser
 290 295 300
 Arg Asp Pro His Val Pro Val Met Pro Tyr Val Gln Ile Phe Tyr Glu
 305 310 315 320
 Met Thr Asp Tyr Leu Leu Pro Leu Glu Glu Leu Glu His Ser Leu Gly
 325 330 335
 Glu Ser Ala Ala Gln Gly Val Ala Gly Ala Val Leu Trp Leu Ser Ser
 340 345 350
 Asp Lys Thr Ser Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile Lys Ala Tyr Met
 355 360 365
 Asp Ser Thr Leu Gly Pro Phe Ile Val Asn Val Thr Ser Ala Ala Leu
 370 375 380
 Leu Cys Ser Glu Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Val Arg His
 385 390 395 400
 Pro Ser Tyr Pro Glu Ala Leu Leu Thr Leu Asn Pro Ala Ser Phe Ser
 405 410 415
 Ile Glu Leu Thr His Asp Gly Arg Pro Pro Ser Leu Lys Gly Thr Leu
 420 425 430
 Ser Leu Lys Asp Arg Ala Gln Met Ala Met Lys Phe Arg Cys Arg Cys
 435 440 445
 Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Lys Trp Cys Asp Lys Arg Gly Met
 450 455 460

<210> 18
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <223> 玻尿酸酶2

<400> 18
 Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Gly Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Lys Ala
 50 55 60
 Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Thr Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ser Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Gly Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Glu Lys Asp Val Tyr Arg Gln Ser Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Ser Asp Arg Val Met Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Asn Thr Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Gln His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ala Arg Asn Asp Gln Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asp Glu
 245 250 255
 Thr Leu Ala Ser Ser Val His Ser Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Arg Glu Ala Leu Arg Val Ala His Thr His His Ala Asn His Ala Leu
 275 280 285
 Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Thr Arg Gly Leu Thr Gly
 290 295 300
 Leu Ser Gln Val Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Ser Ala Gly Val Ile Phe Trp Gly Asp Ser Glu Asp Ala Ser Ser
 325 330 335
 Met Glu Thr Cys Gln Tyr Leu Lys Asn Tyr Leu Thr Gln Leu Leu Val
 340 345 350
 Pro Tyr Ile Val Asn Val Ser Trp Ala Thr Gln Tyr Cys Ser Trp Thr
 355 360 365
 Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asn Pro Ser Ala Asn
 370 375 380
 Thr Phe Leu His Leu Asn Ala Ser Ser Phe Arg Leu Val Pro Gly His
 385 390 395 400
 Thr Pro Ser Glu Pro Gln Leu Arg Pro Glu Gly Gln Leu Ser Glu Ala
 405 410 415
 Asp Leu Asn Tyr Leu Gln Lys His Phe Arg Cys Gln Cys Tyr Leu Gly
 420 425 430
 Trp Gly Gly Glu Gln Cys Gln Arg Asn Tyr Lys Gly Ala Ala Gly Asn
 435 440 445
 Ala Ser Arg Ala Trp Ala Gly Ser His Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu
 450 455 460
 Val Ala Val Ala Leu Thr Trp Thr Leu
 465 470

<210> 19
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>

<223> 玻尿酸酶3

<400> 19

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

<210> 20

<211> 435

<212> PRT

<213> 猪 (Sus scrofa)

<220>

<223> 玻尿酸酶

<400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> 猪

<220>
 <223> 玻尿酸酶3

<400> 21
 Met Thr Met Gln Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Met Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Leu Arg Ala Pro Glu Arg Pro Phe Cys
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Ala Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gly Ile Thr Ala Asn His Gly Gln Arg
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Lys Ser Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Val Ser Leu Asp His His Leu Ala Arg Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His Arg Ser Leu Arg Pro Gly Phe Thr Gly Leu Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Gln Ala

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

<210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 褐鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <223> 玻尿酸酶1

<400> 22
 Met Lys Pro Phe Ser Pro Glu Val Ser Pro Asp Pro Cys Pro Ala Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala His Leu Leu Arg Thr Tyr Thr Leu Phe Leu Thr Leu Leu Glu
 20 25 30
 Leu Ala Gln Gly Cys Arg Gly Ser Met Val Ser Asn Arg Pro Phe Ile
 35 40 45
 Thr Val Trp Asn Ala Asp Thr His Trp Cys Leu Lys Asp His Gly Val
 50 55 60
 Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Lys Glu Gln Asn
 65 70 75 80
 Phe Gln Gly Pro Asn Met Thr Ile Phe Tyr Arg Glu Glu Leu Gly Thr
 85 90 95
 Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu Pro
 100 105 110
 Gln Asn Ala Ser Leu Val Thr His Leu Ala His Ala Phe Gln Asp Ile
 115 120 125
 Lys Ala Ala Met Pro Glu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile Asp
 130 135 140
 Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Ser Lys Asp
 145 150 155 160
 Ile Tyr Gln Gln Arg Ser Met Glu Leu Val Arg Ala Glu His Pro Asp
 165 170 175
 Trp Pro Glu Thr Leu Val Glu Ala Glu Ala Gln Gly Gln Phe Gln Glu
 180 185 190
 Ala Ala Glu Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Val Leu
 195 200 205
 Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr Asn
 210 215 220

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

<210> 23
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 褐鼠

<220>
 <223> 玻尿酸酶2

<400> 23
 Met Arg Ala Gly Leu Gly Pro Ile Ile Thr Leu Ala Leu Val Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Ser Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asn Val Pro Thr Gln Glu Cys Ala
 35 40 45
 Pro Arg His Lys Val Pro Leu Asp Leu Arg Ala Phe Asp Val Glu Ala
 50 55 60
 Thr Pro Asn Glu Gly Phe Phe Asn Gln Asn Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ala Ala Gly Met Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Cys Ala His Leu Pro Met
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ala Val Glu Arg Tyr Ile Gln Thr Gln Glu Pro Ala Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Glu Lys Asp Val Tyr Arg Gln Ser Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Ser Asp Arg Ile Val Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Asn Thr Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Gln His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Asp Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ala Gln Asn Asp Gln Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Glu Asn Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asp Lys
 245 250 255
 Thr Leu Ala Ser Ser Lys His Ser Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala His Thr His His Ala Asn His Ala Leu

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

<210> 24
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> 褐鼠

<220>
 <223> 玻尿酸酶3

<400> 24
 Met Ile Thr Gln Leu Gly Leu Thr Leu Val Val Gly Leu Thr Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Val His Val Gln Ala Leu Leu Gln Val Pro Glu Phe Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala Arg Cys Lys Thr Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asp Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn His Gly Gln Arg
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Phe Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Val Ser Leu Asp His His Leu Ala Gln Ala Ala His Gln Ile
 100 105 110
 Leu His Asn Leu Gly Ser Ser Phe Ala Gly Leu Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Tyr Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Thr His Arg Gln
 130 135 140
 Val Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Met Phe Pro Asp
 145 150 155 160
 Leu Asn Pro Gln Glu Gln Leu His Lys Ala Gln Thr Gly Phe Glu Gln
 165 170 175
 Ala Ala Arg Ala Leu Met Glu His Thr Leu Arg Leu Gly Gln Met Leu
 180 185 190
 Arg Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Arg Tyr Pro Val Cys Gly Asn
 195 200 205
 Gly Trp His Asn Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly His Cys His Pro Ala
 210 215 220
 Ile Ile Thr Arg Asn Thr Gln Leu Arg Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Ala Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala Tyr
 245 250 255
 His Gln Thr Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala
 260 265 270
 Leu Thr Gly His Ala His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu
 275 280 285
 Thr His Arg Ser Ser Gly Arg Phe Leu Ser Leu Asp Asp Leu Met Gln
 290 295 300
 Thr Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp
 305 310 315 320

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

<210> 25
 <211> 545
 <212> PRT
 <213> 兔 (Oryctolagus cuniculus)

<220>
 <223> PH20

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

Phe Ser Lys 420 Asn Phe Gln Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Asn Cys Lys 430
 Glu Arg 435 Thr Asp Met Asn Asn Val Arg Thr Val Asn Val Cys Ala Val 440
 Glu Asn Val Cys Ile Asp Thr Asn Val Gly Pro Gln Ala Val Thr Tyr 450
 465 Ala Pro Lys Glu Lys Lys Asp Val Ala His Ile Leu Ser Asn Thr Thr 470
 Ser Ile Asn Ser Ser Thr Thr Met Ser Leu Pro Phe Pro Arg Lys His 485
 Val Ser Gly Cys Leu Leu Val Leu Cys Met Tyr Ser Gln Tyr Leu Asn 490
 Ile Cys Tyr Arg Leu Val Ala Ile Gly Ile Gln His Gly Tyr Tyr Leu 500
 Lys 510
 530 535 540 545

<210> 26
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> 綿羊 (Ovis aries)

<220>
 <223> 玻尿酸酶2

<400> 26
 Met Trp Thr Gly Leu Gly Pro Ala Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Val 1
 Val Ala Trp Ala Thr Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr 5
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asp Val Pro Thr Gln Asp Cys Gly 10
 Pro Arg His Lys Met Pro Leu Asp Pro Lys Asp Met Lys Ala Phe Asp 15
 Val Gln Ala Ser Pro Asn Glu Gly Phe Val Asn Gln Asn Ile Thr Ile 20
 65 Phe Tyr Arg Asp Arg Leu Gly Met Tyr Pro His Phe Asn Ser Val Gly 25
 Arg Ser Val His Gly Gly Val Pro Gln Asn Gly Ser Leu Trp Val His 30
 Leu Glu Met Leu Lys Gly His Val Glu His Tyr Ile Arg Thr Gln Glu 35
 Pro Ala Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Asp Trp Arg Pro Val Trp 40
 Val Arg Asn Trp Gln Asp Lys Asp Val Tyr Arg Arg Leu Ser Arg Gln 45
 145 Leu Val Ala Ser His 150 Pro Asp Trp Pro Glu Arg Ile Val Lys 50
 Glu Ala Gln Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Arg Gln Phe Met Leu Glu 55
 Thr Leu Arg Phe Val Lys Ala Phe Arg Pro Arg His Leu Trp Gly Phe 60
 Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Glu 65
 210 Thr Tyr Thr Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ser Arg Asn Asp Gln 70
 225 Leu Ser Trp Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr 75
 Leu Glu Glu Thr Leu Ala Ser Ser Thr His Gly Arg Asn Phe Val Ser 80
 Phe Arg Val Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala Asp Val His His Ala Asn 85
 His Ala Leu Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Ser Arg Gly 90
 290 Leu Thr Gly Leu Ser Glu Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser 95
 305 Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Phe 100
 Thr Thr Ser Asn Glu Thr Cys Arg Arg Leu Lys Asp Tyr Leu Thr Arg 105
 Ser Leu Val Pro Tyr Val Val Asn Val Ser Trp Ala Ala Gln Tyr Cys 110
 Ser Trp Ala Gln Cys His Gly His Gly Arg Cys Val Arg Arg Asp Pro 115
 370 375 380

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

<210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 綿羊

<220>
 <223> PH20部分序列

<400> 27
 Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Glu Ser Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr His Arg Pro Val
 20 25 30
 Phe Thr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ser Gln Gly Asp Leu Val Asn
 35 40 45
 Ser Val Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile Ile Met Trp
 50 55 60
 Gly Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Met Gln Ser Cys Met Asn Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Tyr Leu Asn Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Leu
 85 90 95
 Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln Gly Val Cys
 100 105 110
 Ile Arg

<210> 28
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 紅毛猩猩 (Pongo pygmaeus)

<220>
 <223> 玻尿酸酶3

<400> 28
 Met Thr Thr Arg Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Lys Ser Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Lys Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Arg Ala
 130 135 140
 Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
 165 170 175
 Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
 180 185 190
 Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
 195 200 205

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

<210> 29
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<220>
 <223> PH20

<400> 29
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Ile Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asn Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Thr Leu Met Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Val Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Leu Thr Thr Gly Val Thr Val His Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Val Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ser Lys
 115 120 125
 Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Pro Gln Ala Thr Asp Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Met Leu Glu Thr Ile Lys Leu Gly Arg
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Arg Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asp
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Val Val
 260 265 270
 Val Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Asn Pro Leu Pro Val Phe Val Tyr Ala
 290 295 300
 Arg Leu Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Arg Glu Glu

305 310 315 320
 Leu Val Ser Thr Leu Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Ser Leu Ser Ile Thr Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Thr Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asp Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Asp Ile Arg Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val His Gly Lys Pro Thr Val Glu Asp Leu Glu Glu Phe Ser Glu Lys
 420 425
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Ser Leu Lys Pro Pro Val Glu Thr Glu Gly Ser Pro Pro
 465 470 475 480
 Ile Phe Tyr Asn Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Thr Thr Met Phe Ile
 485 490 495
 Val Asn Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505 510

<210> 30
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> 豚鼠 (*Cavia porcellus*)

<220>
 <223> PH20

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

Leu Val His Ser Val Gly Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile
 Ile Ile Trp Gly Ser Leu Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile
 Gly Leu Glu Asn Tyr Met Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys Asn Gln
 Gly Ile Cys Thr Arg Lys Asp Trp Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Leu
 Asn Ala Thr Asn Phe Asp Ile Glu Leu Gln Gln Asn Gly Lys Phe Val
 Val His Gly Lys Pro Ser Leu Glu Asp Leu Gln Glu Phe Ser Lys Asn
 Phe His Cys Ser Cys Tyr Thr Asn Val Ala Cys Lys Asp Arg Leu Asp
 Val His Asn Val Arg Ser Val Asn Val Cys Thr Ala Asn Asn Ile Cys
 Ile Asp Ala Val Leu Asn Phe Pro Ser Leu Asp Asp Asp Asp Glu Pro
 Pro Ile Thr Asp Asp Thr Ser Gln Asn Gln Asp Ser Ile Ser Asp Ile
 Thr Ser Ser Ala Pro Pro Ser Ser His Ile Leu Pro Lys Asp Leu Ser
 Trp Cys Leu Phe Leu Leu Ser Ile Phe Ser Gln His Trp Lys Tyr Leu
 Leu

<210> 31
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 褐鼠

<220>
 <223> PH20

<400> 31
 Met Gly Glu Leu Gln Phe Lys Trp Leu Phe Trp Arg Ser Phe Ala Glu
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Thr Phe Gln Thr Val Leu Ile Phe Leu Phe Ile Pro Tyr
 20 25 30
 Ser Leu Thr Val Asp Tyr Arg Ala Thr Pro Val Leu Ser Asp Thr Thr
 35 40 45
 Phe Val Trp Val Trp Asn Val Pro Thr Glu Ala Cys Val Glu Asn Val
 50 55 60
 Thr Glu Pro Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ser Leu Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Ile Gly Gln Pro Val Thr Leu Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Asn Tyr Pro His Ile Asp Ala Gln Gln Thr Glu His His Gly Gly
 100 105 110
 Ile Pro Gln Lys Gly Asp Leu Thr Thr His Leu Val Lys Ala Lys Glu
 115 120 125
 Asp Val Glu Arg Tyr Ile Pro Thr Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ile Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Met Arg Asn Trp Thr Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Ile Tyr Arg Asn Lys Ser Ile Glu Leu Val Gln Ala Ala Asp Pro
 165 170 175
 Ala Ile Asn Ile Thr Glu Ala Thr Val Arg Ala Lys Ala Gln Phe Glu
 180 185 190
 Gly Ala Ala Lys Glu Phe Met Glu Gly Thr Leu Lys Leu Gly Lys His
 195 200 205
 Ile Arg Pro Lys His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr
 210 215 220
 Asn Asn Lys Phe Gln Val Asp Asn Tyr Asp Gly Gln Cys Pro Asp Val
 225 230 235 240
 Glu Lys Lys Arg Asn Asp Asp Leu Asp Trp Leu Trp Lys Glu Ser Thr
 245 250 255
 Gly Leu Tyr Pro Ser Val Tyr Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser Ser Arg
 260 265 270
 Lys Ala Thr Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Val Leu Glu Ser Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Val Ser Asp Glu Ser Asn Pro Val Pro Ile Phe Val Tyr Ile

290 295 300
 Arg Leu Val Phe Thr Asp His Val Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Gln Gly Thr Ser Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ile Trp Asp Ala Met Ser Leu Ala Gln Arg Ser Ala Gly Cys Pro
 340 345 350
 Ile Leu Arg Gln Tyr Met Lys Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Val Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Lys Glu Lys
 370 375 380
 Gly Met Cys Ser Arg Lys Thr Glu Ser Ser Asp Ala Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asp Pro Ser Ser Phe Ser Ile Asn Val Thr Glu Ala Gly Lys Tyr Glu
 405 410 415
 Val Leu Gly Lys Pro Glu Val Lys Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
 420 425 430
 Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Lys Met Thr Cys Glu Glu Thr Ser Asp
 435 440 445
 Met Arg Ser Ile Gln Asp Val Asn Val Cys Met Gly Asp Asn Val Cys
 450 455 460
 Ile Lys Ala Thr Leu Gly Pro Asn Ser Ala Phe His Leu Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Lys Gly Leu Leu Leu Met Thr Thr Leu Ala His Ile Leu His His Leu
 485 490 495
 Pro His Asp Ile Phe Val Phe Pro Trp Lys Met Leu Val Ser Thr Pro
 500 505 510

<210> 32
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <223> PH20

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

Arg Leu Val Phe Thr Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Leu Leu Glu Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Asn Thr Ile Gly Glu Ile Val Ala Leu Gly Thr Ser Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ile Trp Asp Ala Met Ser Leu Ala Gln Arg Ala Ala Gly Cys Pro
 340 345 350
 Ile Leu His Lys Tyr Met Gln Thr Thr Leu Asn Pro Tyr Ile Val Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Thr Leu Cys Asn Glu Lys
 370 375 380
 Gly Met Cys Ser Arg Arg Lys Glu Ser Ser Asp Val Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Ser His Phe Asp Ile Met Leu Thr Glu Thr Gly Lys Tyr Glu
 405 410 415
 Val Leu Gly Asn Pro Arg Val Gly Asp Leu Glu Tyr Phe Ser Glu His
 420 425 430
 Phe Lys Cys Ser Cys Phe Ser Arg Met Thr Cys Lys Glu Thr Ser Asp
 435 440 445
 Val Lys Asn Val Gln Asp Val Asn Val Cys Val Gly Asp Asn Val Cys
 450 455 460
 Ile Lys Ala Lys Val Glu Pro Asn Pro Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Lys Ser Leu Leu Phe Met Thr Thr Leu Gly His Val Leu Tyr His Leu
 485 490 495
 Pro Gln Asp Ile Phe Val Phe Pro Arg Lys Thr Leu Val Ser Thr Pro
 500 505 510

<210> 33

<211> 807

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

<220>

<223> 玻尿酸酶

<400> 33

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

305 Ile Lys Glu Thr Pro Phe Asn Asp Lys Thr Gln Asn Asp Thr Thr Leu
 325 330 335
 Lys Ser Trp Ile Asp Asp Gly Phe Met Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Glu
 340 345 350
 Met Met Asp Leu Ser Arg Gly Arg Ala Ile Ser Arg Glu Asn Glu Thr
 355 360 365
 Ser His Ser Ala Ser Ala Thr Val Met Lys Ser Leu Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Asp Ala Met Asp Asp Ser Thr Lys Ala Lys Tyr Lys Lys Ile Val Lys
 385 390 395 400
 Ser Ser Val Glu Ser Asp Ser Ser Tyr Lys Gln Asn Asp Tyr Leu Asn
 405 410 415
 Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Lys Met Lys Ser Leu Met Thr Asp Asn Ser
 420 425 430
 Ile Ser Lys Asn Gly Leu Thr Gln Gln Leu Lys Ile Tyr Asn Asp Met
 435 440 445
 Asp Arg Val Thr Tyr His Asn Lys Asp Leu Asp Phe Ala Phe Gly Leu
 450 455 460
 Ser Met Thr Ser Lys Asn Val Ala Arg Tyr Glu Ser Ile Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Gly Trp His Thr Gly Ala Gly Met Ser Tyr Leu Tyr Asn
 485 490 495
 Ser Asp Val Lys His Tyr His Asp Asn Phe Trp Val Thr Ala Asp Met
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ser Gly Thr Thr Thr Leu Asp Asn Glu Ile Leu Lys Asp
 515 520 525
 Thr Asp Asp Lys Lys Ser Ser Lys Thr Phe Val Gly Gly Thr Lys Val
 530 535 540
 Asp Asp Gln His Ala Ser Ile Gly Met Asp Phe Glu Asn Gln Asp Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Thr Ala Lys Lys Ser Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Lys Ile Val
 565 570 575
 Phe Leu Gly Thr Gly Ile Lys Ser Thr Asp Ser Ser Lys Asn Pro Val
 580 585 590
 Thr Thr Ile Glu Asn Arg Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr Asp
 595 600 605
 Asp Lys Gln Thr Thr Asn Ser Asp Asn Gln Glu Asn Asn Ser Val Phe
 610 615 620
 Leu Glu Ser Thr Asp Thr Lys Lys Asn Ile Gly Tyr His Phe Leu Asn
 625 630 635 640
 Lys Pro Lys Ile Thr Val Lys Lys Glu Ser His Thr Gly Lys Trp Lys
 645 650 655
 Glu Ile Asn Lys Ser Gln Lys Asp Thr Gln Lys Thr Asp Glu Tyr Tyr
 660 665 670
 Glu Val Thr Gln Lys His Ser Asn Ser Asp Asn Lys Tyr Gly Tyr Val
 675 680 685
 Leu Tyr Pro Gly Leu Ser Lys Asp Val Phe Lys Thr Lys Lys Asp Glu
 690 695 700
 Val Thr Val Val Lys Gln Glu Asp Asp Phe His Val Val Lys Asp Asn
 705 710 715 720
 Glu Ser Val Trp Ala Gly Val Asn Tyr Ser Asn Ser Thr Gln Thr Phe
 725 730 735
 Asp Ile Asn Asn Thr Lys Val Glu Val Lys Ala Lys Gly Met Phe Ile
 740 745 750
 Leu Lys Lys Lys Asp Asp Asn Thr Tyr Glu Cys Ser Phe Tyr Asn Pro
 755 760 765
 Glu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Ile Glu Ser Lys Ile Ser Met Thr
 770 775 780
 Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Lys Asn Thr Ser Thr Ser Asn Glu Ser Gly
 785 790 795 800
 Val His Phe Glu Leu Thr Lys
 805

<210> 34
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 醭膿鏈球菌 (Streptococcus pyogenes) 噬菌體H4489A

<220>
 <223> 玻尿酸酶

<400> 34
 Met Thr Glu Asn Ile Pro Leu Arg Val Gln Phe Lys Arg Met Ser Ala
 1 5 10 15



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

<210> 35

<211> 1628

<212> PRT

<213> 產氣莢膜梭菌 (Clostridium perfringens)

<220>

<223> 玻尿酸酶

<400> 35

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

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145 | Lys | His | Val | Phe | Asn | Gln | Leu | Glu | Glu | Gly | Asn | Lys | Ile | Gln | Ser | Phe |
| | Arg | Ala | Asp | Asp | Tyr | Ala | Glu | Val | Ala | His | Arg | Gly | Phe | Ile | Glu | Gly |
| | Tyr | Tyr | Gly | Asn | Pro | Trp | Ser | Asn | Glu | Asp | Arg | Ala | Glu | Leu | Met | Lys |
| | Phe | Gly | Gly | Asp | Tyr | Lys | Leu | Asn | Gln | Tyr | Val | Phe | Ala | Pro | Lys | Asp |
| | Asp | Pro | Tyr | His | Asn | Ser | Lys | Trp | Arg | Asp | Leu | Tyr | Pro | Glu | Glu | Lys |
| | Leu | Ser | Glu | Ile | Lys | Lys | Leu | Ala | Gln | Val | Gly | Asn | Glu | Thr | Lys | Asn |
| | Arg | Tyr | Val | Tyr | Ala | Leu | His | Pro | Phe | Met | Asn | Asn | Pro | Val | Arg | Phe |
| | Asp | Thr | Glu | Glu | Asn | Tyr | Gln | Asn | Asp | Leu | Gly | Val | Ile | Lys | Ala | Lys |
| | Phe | Thr | Gln | Leu | Leu | Glu | Asn | Asp | Val | Arg | Gln | Phe | Ala | Ile | Leu | Ala |
| | Asp | Asp | Ala | Ser | Ala | Pro | Ala | Gln | Gly | Ala | Ser | Met | Tyr | Val | Lys | Leu |
| | Leu | Thr | Asp | Leu | Thr | Arg | Trp | Leu | Glu | Glu | Gln | Gln | Ser | Thr | Tyr | Pro |
| | Asp | Leu | Lys | Thr | Asp | Leu | Met | Phe | Cys | Pro | Ser | Asp | Tyr | Tyr | Gly | Asn |
| | Gly | Ser | Ser | Ala | Gln | Leu | Lys | Glu | Leu | Asn | Lys | Ala | Glu | Asp | Asn | Val |
| | Ser | Ile | Val | Met | Thr | Gly | Gly | Arg | Ile | Trp | Gly | Glu | Val | Asp | Glu | Asn |
| | Phe | Ala | Asn | Asn | Phe | Met | Asn | Asn | Ile | Ser | Thr | Glu | Gly | His | Pro | Gly |
| | Arg | Ala | Pro | Phe | Phe | Trp | Ile | Asn | Trp | Pro | Cys | Ser | Asp | Asn | Ser | Lys |
| | Gln | His | Leu | Ile | Met | Gly | Gly | Asn | Asp | Thr | Phe | Leu | His | Pro | Gly | Val |
| | Asp | Pro | Ser | Lys | Ile | Asp | Gly | Ile | Val | Leu | Asn | Pro | Met | Gln | Gln | Ala |
| | Glu | Ala | Asn | Lys | Ser | Ala | Leu | Phe | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Ala | Trp | Asn |
| | Ile | Trp | Asp | Asn | Lys | Glu | Glu | Ala | Asp | Glu | Asn | Trp | Asn | Asp | Ser | Phe |
| | Lys | Tyr | Met | Asp | His | Gly | Thr | Ala | Glu | Glu | Thr | Asn | Ser | Ser | Leu | Ala |
| | Leu | Arg | Glu | Ile | Ser | Lys | His | Met | Ile | Asn | Gln | Asn | Met | Asp | Gly | Arg |
| | Val | Arg | Pro | Leu | Gln | Glu | Ser | Val | Glu | Leu | Ala | Pro | Lys | Leu | Glu | Ala |
| | Phe | Lys | Gln | Lys | Tyr | Asp | Ser | Gly | Ala | Ser | Ile | Lys | Glu | Asp | Ala | Leu |
| | Glu | Leu | Ile | Ala | Glu | Phe | Thr | Asn | Leu | Gln | Lys | Ala | Ala | Asp | Tyr | Tyr |
| | Lys | Asn | Asn | Pro | Gly | Asn | Glu | Arg | Thr | Arg | Asp | Gln | Ile | Ile | Tyr | Trp |
| | Leu | Asn | Cys | Trp | Glu | Asp | Thr | Met | Asp | Ala | Ala | Ile | Gly | Tyr | Leu | Lys |
| | Ser | Ala | Ile | Ala | Ile | Glu | Glu | Gly | Asp | Asp | Glu | Ala | Ala | Trp | Ala | Asn |
| | Tyr | Ser | Glu | Ala | Gln | Gly | Ala | Phe | Glu | Lys | Ser | Lys | Thr | Tyr | Gly | Phe |
| | His | Tyr | Val | Asp | His | Thr | Glu | Tyr | Ala | Glu | Val | Gly | Val | Gln | His | Ile |
| | Val | Pro | Phe | Ile | Lys | Ser | Met | Gly | Gln | Asn | Leu | Ser | Val | Val | Ile | Gly |
| | Ser | Ile | Val | Asp | Pro | Asn | Arg | Ile | Ile | Ala | Thr | Tyr | Ile | Ser | Asn | Arg |
| | Gln | Asp | Ala | Pro | Thr | Gly | Asn | Pro | Asp | Asn | Ile | Phe | Asp | Asn | Asn | Ala |
| | Ser | Thr | Glu | Leu | Val | Tyr | Lys | Asn | Pro | Asn | Arg | Ile | Asp | Val | Gly | Thr |
| | Tyr | Val | Gly | Val | Lys | Tyr | Ser | Asn | Pro | Ile | Thr | Leu | Asn | Asn | Val | Glu |
| | Phe | Leu | Met | Gly | Ala | Asn | Ser | Asn | Pro | Asn | Asp | Thr | Met | Gln | Lys | Ala |
| | Lys | Ile | Gln | Tyr | Thr | Val | Asp | Gly | Arg | Glu | Trp | Ile | Asp | Leu | Glu | Glu |
| | Gly | Val | Glu | Tyr | Thr | Met | Pro | Gly | Ala | Ile | Lys | Val | Glu | Asn | Leu | Asp |

Leu Lys Val Arg Gly Val Arg Leu Ile Ala Thr Glu Ala Arg Glu Asn
 755 760 765
 770 775 780
 Thr Trp Leu Gly Val Arg Asp Ile Asn Val Asn Lys Lys Glu Asp Ser
 785 790 795 800
 Asn Ser Gly Val Glu Phe Asn Pro Ser Leu Ile Arg Ser Glu Ser Trp
 805 810 815
 Gln Val Tyr Glu Gly Asn Glu Ala Asn Leu Leu Asp Gly Asp Asp Asn
 820 825 830
 Thr Gly Val Trp Tyr Lys Thr Leu Asn Gly Asp Thr Ser Leu Ala Gly
 835 840 845
 Glu Phe Ile Gly Leu Asp Leu Gly Lys Glu Ile Lys Leu Asp Gly Ile
 850 855 860
 Arg Phe Val Ile Gly Lys Asn Gly Gly Gly Ser Ser Asp Lys Trp Asn
 865 870 875 880
 Lys Phe Lys Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Asn Glu Ser Trp Thr Thr Ile
 885 890 895
 Lys Glu Tyr Asp Lys Thr Gly Ala Pro Ala Gly Lys Asp Val Ile Glu
 900 905 910
 Glu Ser Phe Glu Thr Pro Ile Ser Ala Lys Tyr Ile Arg Leu Thr Asn
 915 920 925
 Met Glu Asn Ile Asn Lys Trp Leu Thr Phe Ser Glu Phe Ala Ile Ile
 930 935 940
 Ser Asp Glu Leu Glu Asn Ala Gly Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Asn
 945 950 955 960
 Thr Glu Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ala Lys Glu Asp Val Thr Lys Leu
 965 970 975
 Ile Pro Thr Asp Asp Ile Ser Leu Asn His Gly Glu Tyr Ile Gly Val
 980 985 990
 Lys Leu Asn Arg Ile Lys Asp Leu Ser Asn Ile Asn Leu Glu Ile Ser
 995 1000 1005
 Asn Asp Thr Gly Leu Lys Leu Gln Ser Ser Met Asn Gly Val Glu Trp
 1010 1015 1020
 Thr Glu Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Glu Asp Gly Arg Tyr Val Arg
 1025 1030 1035 1040
 Leu Ile Asn Thr Ser Asn Glu Ala Val Asn Phe Asn Leu Thr Lys Phe
 1045 1050 1055
 Glu Val Asn Ser Asn Glu Val Tyr Glu Pro Ser Leu Val Asp Ala Tyr
 1060 1065 1070
 Val Gly Asp Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Asp Gly Asp Leu Lys Thr
 1075 1080 1085
 Arg Val Lys Phe Leu Gly Ala Pro Ser Thr Gly Asp Thr Ile Val Tyr
 1090 1095 1100
 Asp Leu Gly Gln Glu Ile Leu Val Asp Asn Leu Lys Tyr Val Val Leu
 1105 1110 1115 1120
 Asp Thr Glu Val Asp His Val Arg Asp Gly Lys Ile Gln Leu Ser Leu
 1125 1130 1135
 Asp Gly Glu Thr Trp Thr Asp Ala Ile Thr Ile Gly Asp Gly Val Glu
 1140 1145 1150
 Asn Gly Val Asp Asp Met Phe Ser Thr Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Lys
 1155 1160 1165
 His Gly Asn Gln Ser Gly Gly Ile Val Pro Ile Asp Ser Ala Tyr Val
 1170 1175 1180
 Glu Gly Asp Asn Leu Asn Gln Lys Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Phe
 1185 1190 1195 1200
 Thr Ala Pro Tyr Arg His Arg Trp Thr Val Ile Asn Glu Leu Met Ile
 1205 1210 1215
 Asn Asn Gly Glu Tyr Ile Ser Thr Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ile Ser
 1220 1225 1230
 Asn Pro Ile Glu Glu Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asn Leu Arg Asp Gly
 1235 1240 1245
 Asn Leu Thr Thr Ser Tyr Lys Pro Asn Thr Asn Asn Gly Glu Ile Ser
 1250 1255 1260
 Glu Gly Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Ser Glu Lys Thr Asp Val Arg Lys
 1265 1270 1275 1280
 Val Thr Ile Val Gln Ser Gly Ser Ser Ile Ser Asn Ala Lys Val Met
 1285 1290 1295
 Ala Arg Val Gly Asp Gly Ser Glu Asn Val Thr Asp Gln Trp Val Gln
 1300 1305 1310
 Leu Gly Thr Leu Ser Asn Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Arg Asp Tyr
 1315 1320 1325
 Asn Asn Ile Tyr Glu Ile Lys Ile Glu Trp Thr Asp Val Ala Pro Asn
 1330 1335 1340
 Ile Tyr Glu Ile Ile Thr Leu Asn Gln Glu Phe Glu Phe Pro Val Asn
 1345 1350 1355 1360
 Asp Ser Leu Lys Ala Lys Tyr Asp Glu Leu Ile Asn Leu Ser Gly Asp

1365 1370 1375
 Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Phe Glu Thr Leu Lys Glu Ala Leu Asn Glu
 1380 1385 1390
 Ala Lys Ser Ile Leu Asp Asp Ser Asn Ser Ser Gln Lys Lys Ile Asp
 1395 1400 1405
 Lys Ala Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ala Glu Glu Arg Leu Asp Leu Arg
 1410 1415 1420
 Ala Thr Asp Phe Glu Asp Phe Asn Lys Val Leu Thr Leu Gly Asn Ser
 1425 1430 1435 1440
 Leu Val Glu Glu Glu Tyr Thr Ala Glu Ser Trp Ala Leu Phe Ser Glu
 1445 1450 1455
 Val Leu Glu Ala Ala Asn Glu Ala Asn Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Thr
 1460 1465 1470
 Gln Asp Gln Ile Asn Gln Ile Val Ile Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys
 1475 1480 1485
 Ala Leu Val Lys Glu Thr Pro Glu Val Asp Lys Thr Asn Leu Gly Glu
 1490 1495 1500
 Leu Ile Asn Gln Gly Lys Ser Leu Leu Asp Glu Ser Val Glu Gly Phe
 1505 1510 1515 1520
 Asn Val Gly Glu Tyr His Lys Gly Ala Lys Asp Gly Leu Thr Val Glu
 1525 1530 1535
 Ile Asn Lys Ala Glu Glu Val Phe Asn Lys Glu Asp Ala Thr Glu Glu
 1540 1545 1550
 Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Ser Leu Glu Gly Ala Ile Ala Arg Phe
 1555 1560 1565
 Asn Ser Leu Leu Ile Glu Glu Ser Thr Gly Asp Phe Asn Gly Asn Gly
 1570 1575 1580
 Lys Ile Asp Ile Gly Asp Leu Ala Met Val Ser Lys Asn Ile Gly Ser
 1585 1590 1595 1600
 Thr Thr Asn Thr Ser Leu Asp Leu Asn Lys Asp Gly Ser Ile Asp Glu
 1605 1610 1615
 Tyr Glu Ile Ser Phe Ile Asn His Arg Ile Leu Asn
 1620 1625

<210> 36
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 玻尿酸酶-1[前驅體]

<400> 36
 Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Asp Met Ala Gln Gly Phe Arg Gly Pro Leu Leu Pro Asn Arg Pro Phe
 20 25 30
 Thr Thr Val Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Glu Arg His Gly
 35 40 45
 Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Pro Gly Gln
 50 55 60
 Thr Phe Arg Gly Pro Asp Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu
 85 90 95
 Pro Gln Asn Ala Ser Leu Ile Ala His Leu Ala Arg Thr Phe Gln Asp
 100 105 110
 Ile Leu Ala Ala Ile Pro Ala Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
 115 120 125
 Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Thr Lys
 130 135 140
 Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Ala Gln His Pro
 145 150 155 160
 Asp Trp Pro Ala Pro Gln Val Glu Ala Val Ala Gln Asp Gln Phe Gln
 165 170 175
 Gly Ala Ala Arg Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Arg Ala
 180 185 190
 Leu Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr
 195 200 205
 Asn Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Ser Gly
 210 215 220
 Ile Arg Ala Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Met Pro Ala Val Leu Glu Gly Thr Gly
 245 250 255

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

<210> 37
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 玻尿酸酶-2[前驅體]

<400> 37
 Met Arg Ala Gly Pro Gly Pro Thr Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Trp Ala Met Glu Leu Lys Pro Thr Ala Pro Pro Ile Phe Thr
 20 25 30
 Gly Arg Pro Phe Val Val Ala Trp Asp Val Pro Thr Gln Asp Cys Gly
 35 40 45
 Pro Arg Leu Lys Val Pro Leu Asp Leu Asn Ala Phe Asp Val Gln Ala
 50 55 60
 Ser Pro Asn Glu Gly Phe Val Asn Gln Asn Ile Thr Ile Phe Tyr Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Leu Gly Leu Tyr Pro Arg Phe Asp Ser Ala Gly Arg Ser Val
 85 90 95
 His Gly Gly Val Pro Gln Asn Val Ser Leu Trp Ala His Arg Lys Met
 100 105 110
 Leu Gln Lys Arg Val Glu His Tyr Ile Arg Thr Gln Glu Ser Ala Gly
 115 120 125
 Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Asp Trp Arg Pro Val Trp Val Arg Asn
 130 135 140
 Trp Gln Asp Lys Asp Val Tyr Arg Arg Leu Ser Arg Gln Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Asp Trp Pro Pro Asp Arg Ile Val Lys Gln Ala Gln
 165 170 175
 Tyr Glu Phe Glu Phe Ala Ala Gln Gln Phe Met Leu Glu Thr Leu Arg
 180 185 190
 Tyr Val Lys Ala Val Arg Pro Arg His Leu Trp Gly Phe Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Pro Asp Cys Tyr Asn His Asp Tyr Val Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Arg Cys Pro Asp Val Glu Val Ala Arg Asn Asp Gln Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ser Val Tyr Leu Asp Glu
 245 250 255
 Thr Leu Ala Ser Ser Arg His Gly Arg Asn Phe Val Ser Phe Arg Val
 260 265 270
 Gln Glu Ala Leu Arg Val Ala Arg Thr His His Ala Asn His Ala Leu
 275 280 285
 Pro Val Tyr Val Phe Thr Arg Pro Thr Tyr Ser Arg Arg Leu Thr Gly
 290 295 300
 Leu Ser Glu Met Asp Leu Ile Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 Gly Ala Ala Gly Val Ile Leu Trp Gly Asp Ala Gly Tyr Thr Thr Ser

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

<210> 38
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 玻尿酸酶-3[前驅體]

<400> 38
 Met Thr Thr Gln Leu Gly Pro Ala Leu Val Leu Gly Val Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Cys Gly Gln Pro Leu Pro Gln Val Pro Glu Arg Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Leu Trp Asn Val Pro Ser Ala His Cys Glu Ala Arg Phe Gly Val
 35 40 45
 His Leu Pro Leu Asn Ala Leu Gly Ile Ile Ala Asn Arg Gly Gln His
 50 55 60
 Phe His Gly Gln Asn Met Thr Ile Phe Tyr Lys Asn Gln Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Pro Tyr Phe Gly Pro Arg Gly Thr Ala His Asn Gly Gly Ile Pro
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Leu Asp Arg His Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ile
 100 105 110
 His His Ser Leu Arg Pro Gly Phe Ala Gly Pro Ala Val Leu Asp Trp
 115 120 125
 Glu Glu Trp Cys Pro Leu Trp Ala Gly Asn Trp Gly Arg Arg Arg Ala
 130 135 140
 Tyr Gln Ala Ala Ser Trp Ala Trp Ala Gln Gln Val Phe Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Asp Pro Gln Glu Gln Leu Tyr Lys Ala Tyr Thr Gly Phe Glu Gln Ala
 165 170 175
 Ala Arg Ala Leu Met Glu Asp Thr Leu Arg Val Ala Gln Ala Leu Arg
 180 185 190
 Pro His Gly Leu Trp Gly Phe Tyr His Tyr Pro Ala Cys Gly Asn Gly
 195 200 205
 Trp His Ser Met Ala Ser Asn Tyr Thr Gly Arg Cys His Ala Ala Thr
 210 215 220
 Leu Ala Arg Asn Thr Gln Leu His Trp Leu Trp Ala Ala Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Ser Ile Tyr Leu Pro Pro Arg Leu Pro Pro Ala His His
 245 250 255
 Gln Ala Phe Val Arg His Arg Leu Glu Glu Ala Phe Arg Val Ala Leu
 260 265 270
 Val Gly His Arg His Pro Leu Pro Val Leu Ala Tyr Val Arg Leu Thr
 275 280 285
 His Arg Arg Ser Gly Arg Phe Leu Ser Gln Asp Asp Leu Val Gln Ser
 290 295 300
 Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Val Leu Trp Gly
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Cys Trp His Leu His Asp
 325 330 335
 Tyr Leu Val Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Val Ile Asn Val Thr Arg Ala
 340 345 350
 Ala Met Ala Cys Ser His Gln Arg Cys His Gly His Gly Arg Cys Ala
 355 360 365

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

<210> 39
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 玻尿酸酶-4

<400> 39
 Met Lys Val Leu Ser Glu Gly Gln Leu Lys Leu Cys Val Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Val His Leu Thr Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Ile Leu Lys Ser Ile
 20 25 30
 Ser Cys Leu Lys Pro Ala Arg Leu Pro Ile Tyr Gln Arg Lys Pro Phe
 35 40 45
 Ile Ala Ala Trp Asn Ala Pro Thr Asp Gln Cys Leu Ile Lys Tyr Asn
 50 55 60
 Leu Arg Leu Asn Leu Lys Met Phe Pro Val Ile Gly Ser Pro Leu Ala
 65 70 75 80
 Lys Ala Arg Gly Gln Asn Val Thr Ile Phe Tyr Val Asn Arg Leu Gly
 85 90 95
 Tyr Tyr Pro Trp Tyr Thr Ser Gln Gly Val Pro Ile Asn Gly Gly Leu
 100 105 110
 Pro Gln Asn Ile Ser Leu Gln Val His Leu Glu Lys Ala Asp Gln Asp
 115 120 125
 Ile Asn Tyr Tyr Ile Pro Ala Glu Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile
 130 135 140
 Asp Trp Glu Tyr Trp Arg Pro Gln Trp Ala Arg Asn Trp Asn Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Tyr Arg Gln Lys Ser Arg Lys Leu Ile Ser Asp Met Gly Lys
 165 170 175
 Asn Val Ser Ala Thr Asp Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Val Thr Phe Glu
 180 185 190
 Glu Ser Ala Lys Ala Phe Met Lys Glu Thr Ile Lys Leu Gly Ile Lys
 195 200 205
 Ser Arg Pro Lys Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Tyr Pro Asp Cys His
 210 215 220
 Asn Tyr Asn Val Tyr Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Leu Arg Asn Asn Glu Leu Ser Trp Leu Trp Asn Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Gly Val Trp Lys Ser Leu Gly Asp Ser Glu
 260 265 270
 Asn Ile Leu Arg Phe Ser Lys Phe Arg Val His Glu Ser Met Arg Ile
 275 280 285
 Ser Thr Met Thr Ser His Asp Tyr Ala Leu Pro Val Phe Val Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Leu Gly Tyr Arg Asp Glu Pro Leu Phe Phe Leu Ser Lys Gln Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Ser Thr Ile Gly Glu Ser Ala Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Asp Met Asn Leu Thr Ala Ser Lys Ala Asn Cys Thr
 340 345 350
 Lys Val Lys Gln Phe Val Ser Ser Asp Leu Gly Ser Tyr Ile Ala Asn
 355 360 365
 Val Thr Arg Ala Ala Glu Val Cys Ser Leu His Leu Cys Arg Asn Asn
 370 375 380
 Gly Arg Cys Ile Arg Lys Met Trp Asn Ala Pro Ser Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Ala Ser Tyr His Ile Glu Ala Ser Glu Asp Gly Glu Phe Thr
 405 410 415
 Val Lys Gly Lys Ala Ser Asp Thr Asp Leu Ala Val Met Ala Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ser Cys His Cys Tyr Gln Gly Tyr Glu Gly Ala Asp Cys Arg Glu
 435 440 445
 Ile Lys Thr Ala Asp Gly Cys Ser Gly Val Ser Pro Ser Pro Gly Ser

450
Leu Met Thr Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ser Tyr Arg Ser Ile Gln
465 470 475 480
Leu

<210> 40
<211> 467
<212> PRT
<213> 智慧人

<220>
<223> sHuPH20前驅體1-467

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

<210> 41
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> sHuPH20前驅體1-477

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 478

<212> PRT
<213> 智慧人

<220>
<223> sHuPH20前驅體1-478

<400> 42
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
405 410 415
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
465 470 475

<210> 43
<211> 479
<212> PRT
<213> 智慧人

<220>

<223> sHuPH20前驅體1-479

<400> 43

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

<210> 44

<211> 480

<212> PRT

<213> 智慧人

<220>

<223> sHuPH20前驅體1-480

<400> 44

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

<210> 45
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> sHuPH20前驅體1-481

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

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

<210> 46
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> sHuPH20前驅體1-483

<400> 46
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

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

<210> 47
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> sHuPH20成熟36-467

<400> 47
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60

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

<210> 48
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> sHuPH20成熟36-483

<400> 48
 Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg Ile Asn Ala
 35 40 45
 Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys Lys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val Ile Asp Trp
 100 105 110
 Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro Lys Asp Val
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn Val Gln Leu
 130 135 140

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

<210> 49
 <211> 1446
 <212> DNA
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 編碼可溶性rHuPH20「前驅體」之DNA

<400> 49
 atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag tttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 cctcctgtta ttccaaatgt gcccttccct tggccttggg atgccccaaag tgaattttgt 180
 cttgaaaaat ttgatgagcc actagatagc agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
 ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttaigtgt atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatitccta 360
 caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatltt atatgccagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccctt gggcaagaaa ctggaaacct 480
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc acaaaaatgt acaacttagt 540
 ctacagagg ccaactgaaa agcaaaacaa gaatttgaag aggcagggaa ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
 tttccggatt gttaacaaca tcaactataag aaaccctgtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaataa aaagaatga tgatctcagc tgggttggga atgaaagcac tgctctttac 780
 ccaatccatt atttgaacac tcagcagctt cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagtccggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
 tttgcataata cccgatagtt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
 cttgtgtata catttggcga aactgttgcct ctgggtgtct ctggaattgt aatatgggga 1020
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgcctc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacttcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgtct 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtacta tcttcacctc 1200
 aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatltt attgcagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaagc tgaatgtaaaa gacactgatg ctgtttagtg gtgtattgtc 1380
 gatggtgtct glatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
 ttctac 1446

<210> 50
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> PH20變異體P48A

<400> 50

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Ala
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

<210> 51

<211> 509
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<220>
 <223> 前驅PH20變異體L499W

<400> 51
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95
 Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140
 Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175
 Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270
 Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
 290 295 300
 Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 305 310 315 320
 Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 325 330 335
 Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495
 Ser Ile Trp Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
 500 505

<210> 52



<211> 6630
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HZ24載體

<400> 52

```

tcaatatgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattait gactagltat laatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat ataiggagtt ccggttaca taacttacgg taatggccc 240
gcctggctga ccgccaacg acccccgcc a1lgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaacgctc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcalat gccaaagtcg ccccttatig acgtcaatga 420
cggtaaa1gg cccgcttggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttccctacttg 480
gcagtagatc taccgttag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtagac 540
caatggggcgt ggatagcggg ttgactcacc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatggggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgic gtaataacc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg t1acgggtgg gaggctctata taagcagagc 720
tcgttttagt aaccctaga tcatagaag ctttatggcg gtatgtttac acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tccgagacaga gaagactctt cgttttctga taggcaccta ttggctttac 960
tgacatccac ttgccccttc tctccacagg tgcctacc ccagtcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatag ctcactata ggctagcatg ggagtgtctaa aattcaagca 1080
catcttttcc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttctt 1140
tcgtattcca tgttgcctga ctctgaattt cagagcacct cctgtttatc caaatgtgcc 1200
tttctcttgg ccttggaaatg ccccaagtga attttgcct ggaaaatttg atgagccact 1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaagggtg 1320
tacaataatt tatgttgata gacttggcta ctatcttacc atagattcaa tcacaggagt 1380
aactgtgaat ggaggaaatcc cccagaagat ttctttacaa gaccatctgg acaaaagctaa 1440
gaaagacatt accatttata tgcagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga 1500
agaatggaga cccggttggc caagaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggctc 1560
tatlgaatg gttcagcaac aaaaatgata acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc 1620
aaaacaagaa ttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa 1680
attactcgg ccaaatcact tgtggggta tttctttt cgggattgtt acaacctca 1740
ctataagaaa cccggttaca atggaaatg ctccaatgta gaaataaaaa gaaatgatga 1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttacca tccatttatt tgaacactca 1860
gcagttctct gtatgtgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatacagagt 1920
ttccaaaata cctgtgcaa aaagtccact tccggttttt gcataatccc gcatagtttt 1980
tactgatcaa gtttgaat tcccttctca agatgaactt gttatatac ttggcgaaaac 2040
tgttgccttg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat 2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattatcat ggagactata ctgaatctt acataatcaa 2160
cgtcacacta gcagcaaaa tgtgttagcca agtgccttgc caggagcaag gagtgtgtat 2220
aaggaaaaaac ttgacttcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca 2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acaactgaag acctggagca 2340
atttctgaa aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaaagctga 2400
tgtaaaaagc actgatgctg ttgatgtgtg tattgtctgt ggtgtctgta tagatgcttt 2460
tctaaaacct cccatgggga cagaagaacc tcaaatttt tactgaggat ccatagctaa 2520
cgccccctc cctccccccc ccctaactgt actggccgaa gccgcttggga ataaggccgg 2580
tgtgctttg tctatattgt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgaggggc 2640
cggaaacctg gccctgtctt cttagcagagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa 2700
ggaaatgcaag gttctgtag tgtcgtgaa gaaagcagtt cctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacacagt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc cccaccctgg cgacaggtgc 2820
ctctcgggcc aaaagcccag tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagctc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtgaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccc gaaggtacc cattgtatgg gatctgatct ggggctctgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagttagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggcagctg ttttcccttt aaaaacacga tgataagctt gccacaacc acagcggccc 3120
ctgccatcat ggttccgaca ttgaactgca tctctgcccgt gtcccaaat atggggattg 3180
gcaagaaacg agactacc tggcctccgc tcaggaacga gtccaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctctcagtg gaaggtaac agaactggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tccctgagaag aatcgacct taaaggacag aatlaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc atttcttgc caaaagttg gatgatgctt 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaaagtaga catggttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc ttigtgaca 3540
ggatcatgca ggaatttga agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcctctct ctgaggctca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg taccttaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata catltagtag ttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtag aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcagggggag atgtgggagg tttttaaag caagtaaac ctctacaat gtggtaaaat 3960
cgataagga cggggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc ctccccaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcatlaag cgcggcgggt 4080

```

```

gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctigccagcg ccctagcggc cgctcctttc 4140
gcttctctcc ctctcttcti cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg attttagtgc ttacggcacc tgcaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtagtg gttcacgtag tgggcatatg ccctgataga cgggttttcc ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacct 4380
atctcggctc atcttttga tttataaggg attttgcgga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga ttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatataac gcttacaatt 4500
tccigtatcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatggccgat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gctttgtctg tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgataccg ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcacttta cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttattttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg ctcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtatcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 4980
cggcattttg ccttctctgt tttgtctacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt ggggtcacga tagtggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tgcgccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggg attatcccggt attgacgccc ggcaagagca actcggctgc cgcatacact 5220
atctcagaa tgactttggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgcagttaag gaatttgcct agtctgcca taaccatgag tgataaacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tgccttggat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgctt gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgtctgat aaactggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcatig cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtaotgtagt tatctacac acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gttfactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatftaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accocgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggtg actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagttagacc gtatgttagc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgcta at cctgttaccg gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttctg 6300
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgcaccgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc tccagggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgcacc ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tctcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcttg gccttttgc 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

```

<210> 53
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <223> 二氢葉酸還原酶

```

<400> 53
Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile
 1          5          10          15
Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe Lys
 20          25          30
Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn
 35          40          45
Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys Asn
 50          55          60
Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys
 65          70          75          80
Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ala
 85          90          95
Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met Val
100          105          110
Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln Pro
115          120          125
Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu Ser
130          135          140
Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu Pro
145          150          155          160
Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile Lys

```



Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 165 170 185

175

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> His人工序列

<220>
 <223> His標籤

<400> 54
 His His His His His His
 1 5

<210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Flag標籤

<400> 55
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 56
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> 智慧人

<220>
 <223> Gen2 mRNA序列

<400> 56
 atgggagtg c taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
 tcccagatag ltttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
 ccctcctgta ttccaaatgt gcctttccctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
 ctgggaaaat ttgatgacc actagatag agcctcttct ctctcatagg aagccccga 240
 ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
 tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
 caagaccatc tggacaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
 ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
 aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
 ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaattgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
 ttccggatt gttacaacca tctactaag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttgtag atgaaagcac tgctctttac 780
 ccatccattt atttgaacac tcagcagctt cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
 ttgcatata cccgatagl ttttactgat caagtttga aattcctttc tcaagatgaa 960
 ctigtgtata catttggcga aactgttgc tgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
 accctcagta laatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca cttagcagcca aaatgtgtag tcaagtgcct 1140
 tggcaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aacttgaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
 aacccagata atttgtctat tcaactttag aaaggtggaa agttcacagi acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatitt atgcagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
 gatgggtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
 ttctactga 1449

七、申請專利範圍：

1. 一種可溶性玻尿酸酶之用途，其係用於調配用於將皮下投藥的單一劑量的免疫球蛋白（IG）之生物可用率增加至通過靜脈內投藥來投藥的相同單一劑量的 IG 之生物可用率之至少 90% 以治療 IG 可治療性疾病或病狀的醫藥品，其中：

該 IG 係經調配以用於皮下單一劑量投藥 0.5 克（g）至 70 g；

該 IG 係調配於 50 mL 至 700 mL 之液體體積中；且

該生物可用率之增加係在當該玻尿酸酶是在投藥 IG 前投藥且在和 IG 相同的位置投藥時實現；

該玻尿酸酶係經調配以用於皮下投藥；

該玻尿酸酶係與該 IG 分開調配且調配於為或約為 5 mL 至 30 mL 之液體體積中；且

該玻尿酸酶係經調配以用於以以下者的量直接單一劑量投藥：每克（g）IG 10-500 單位（U）玻尿酸酶的比例。

2. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 之單一劑量係介於或約介於 20 至 30 克（g）的 IG。

3. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 之單一劑量係介於或約介於 21 g 至 42 g 的 IG。

4. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 之單一劑量係介於或約介於 27 g 至 61 g 的 IG。

5. 如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 之單一劑量係介於或約介於 25.5 g 至 61.2 g 的 IG。

6.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 係自人類血漿純化。

7.如申請專利範圍第 6 項的用途，其中該自人類血漿純化的 IG 係藉由醇份化純化。

8.如申請專利範圍第 7 項的用途，其中組合物中的 IG 係藉由以下者之任一或更多者進一步純化：化學修飾、在胃蛋白酶存在或不存在下在 pH 4.0 培育、聚乙二醇（PEG）沈澱、離子交換層析、酶促裂解、溶劑清潔劑處理、透濾（diafiltration）或超濾。

9.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 含有 IgG、IgA 與 IgM。

10.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中該 IG 含有大於 95% IgG。

11.如申請專利範圍第 10 項的用途，其中該 IG 係單體的。

12.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中組合物中的 IG 進一步含有蛋白穩定賦形劑。

13.如申請專利範圍第 12 項的用途，其中該蛋白穩定賦形劑係選自以下者之一或更多者：甘胺酸、麥芽糖、多元醇、人類血清白蛋白、甘露醇、及非離子型清潔劑。

14.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中組合物中的 IG 製劑之 pH 係或約係 4.2 至 5.4。

15.如申請專利範圍第 1 項的用途，其中組合物中的 IG 製劑之 pH 係或約係 4.6 至 5.1。

16.如申請專利範圍第1項的用途，其中組合物中的IG製劑之pH係或約係4.8至5.0。

17.如申請專利範圍第1項的用途，其中組合物中的IG具有係或約係IG組合物之5%至15% w/v的蛋白質濃度。

18.如申請專利範圍第1項的用途，其中組合物中的IG具有係或約係IG組合物之6%至15% w/v的蛋白質濃度。

19.如申請專利範圍第1項的用途，其中組合物中的IG具有係或約係IG組合物之8%至12% w/v的蛋白質濃度。

20.如申請專利範圍第17項的用途，其中該蛋白質濃度係10% w/v。

21.如申請專利範圍第1項的用途，其中調配物中玻尿酸酶之量係介於或約介於1000單位至10,000單位。

22.如申請專利範圍第1項的用途，其中調配物中玻尿酸酶之量係介於或約介於5000單位至7500單位。

23.如申請專利範圍第1項的用途，其中該可溶性玻尿酸酶係PH20。

24.如申請專利範圍第1項的用途，其中該可溶性玻尿酸酶係綿羊或牛PH20。

25.如申請專利範圍第1項的用途，其中該可溶性玻尿酸酶係選自以下者：具有SEQ ID NOS:4-9之任一者所示的胺基酸之序列、或對SEQ ID NOS: 4-9之任一者展現至少95%序列一致性的胺基酸之序列的多肽。

26.如申請專利範圍第25項的用途，其中該PH20具有對SEQ ID NOS:4-9之任一者展現至少98%序列一致性的胺

基酸之序列。

27.如申請專利範圍第 25 項的用途，其中包含該可溶性玻尿酸酶的組合物係名為 rHuPH20。

28.一種用於增進用於治療 IG 可治療性疾病或病狀的皮下投藥之免疫球蛋白 (IG) 的生物可用率之組合，其包含：

第一組合物，其包含 0.5 克 (g) 至 70 g 經調配以用於直接皮下單一劑量投藥之 IG，其中

該 IG 係調配於 50 mL 至 700 mL 之液體體積中；及

第二組合物，其包含經調配以用於直接皮下單一劑量投藥之可溶性玻尿酸酶，投藥之量為每克 (g) 該 IG 10-500 單位 (U) 玻尿酸酶之比例，其中

該可溶性玻尿酸酶係調配於為或約為 5 mL 至 30 mL 之液體體積中；

該玻尿酸酶係與該 IG 分開調配以在投藥該 IG 前投藥且在和該 IG 相同的位置投藥；且

當與該 IG 組合投藥時，玻尿酸酶的量實現增加的 IG 之生物可用率至藉由靜脈內投藥來投藥的相同單一劑量的 IG 之生物可用率的至少 90% 以治療相同 IG 可治療性疾病或病狀。

29.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 具有係或約係 IG 組合物之 5% 至 25% w/v 的蛋白質濃度。

30.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 具有係或約係該 IG 組合物之 5 至 15% w/v 的蛋白質濃度。

31.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 具有係或約係該 IG 組合物之 6 至 15% w/v 的蛋白質濃度。

32.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 具有係或約係該 IG 組合物之 8 至 12% w/v 的蛋白質濃度。

33.如申請專利範圍第 32 項的組合，其中該蛋白質濃度係 10% w/v。

34.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 係以介於或約介於 20 至 30 克 (g) 的 IG 的單一劑量之量調配。

35.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 係以介於或約介於 21 克至 42 克的 IG 的單一劑量之量調配。

36.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 係以介於或約介於 27 克至 61 克的 IG 的單一劑量之量調配。

37.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 係以介於或約介於 25.5 克至 61.2 克的 IG 的單一劑量之量調配。

38.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 係自人類血漿純化。

39.如申請專利範圍第 38 項的組合，其中該自人類血漿純化的 IG 係藉由醇份化純化。

40.如申請專利範圍第 39 項的組合，其中該 IG 係藉由以下者之任一或多者進一步純化：化學修飾、在胃蛋白酶存在或不存在下在 pH 4.0 培育、聚乙二醇 (PEG) 沈澱、離子交換層析、酶促裂解、溶劑清潔劑處理、透濾或超濾。

41.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 含有 IgG、IgA 與 IgM。

42.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 含有大於 95% IgG。

43.如申請專利範圍第 42 項的組合，其中該 IG 係單體的。

44.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 進一步含有蛋白穩定賦形劑。

45.如申請專利範圍第 44 項的組合，其中該蛋白穩定賦形劑係選自以下者之一或多者：甘胺酸、麥芽糖、多元醇、人類血清白蛋白、甘露醇、及非離子型清潔劑。

46.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中組合物中的 IG 製劑之 pH 係或約係 4.2 至 5.4。

47.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中組合物中的 IG 製劑之 pH 係或約係 4.6 至 5.1。

48.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中組合物中的 IG 製劑之 pH 係或約係 4.8 至 5.0。

49.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該玻尿酸酶係以介於或約介於 1000 單位至 10,000 單位的量調配。

50.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該玻尿酸酶係以介於或約介於 5000 單位至 7500 單位的量調配。

51.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該可溶性玻尿酸酶係 PH20。

52.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該可溶性玻尿酸酶係綿羊或牛 PH20。

53.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該可溶性玻尿酸

酸酶係選自以下者：具有 SEQ ID NOS:4-9 之任一者所示的胺基酸之序列或對 SEQ ID NOS: 4-9 之任一者展現至少 95% 序列一致性的胺基酸之序列的多肽。

54. 如申請專利範圍第 53 項的組合，其中該 PH20 具有對 SEQ ID NOS: 4-9 之任一者展現至少 98% 序列一致性的胺基酸之序列。

55. 如申請專利範圍第 53 項的組合，其中包含該可溶性玻尿酸酶的組合物係名為 rHuPH20。

56. 如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 可治療性疾病或病狀係選自免疫缺乏症、川崎氏病 (Kawasaki's disease)、慢性發炎症髓鞘脫失多發性神經病 (CIDP)、格巴二氏症候群 (Guillain-Barre Syndrome)、特發性血小板減少性紫癍、發炎症肌病、蘭伯特-伊頓肌無力症候群 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、多灶性運動神經病、重症肌無力、莫氏-沃特曼症候群 (Moersch-Woltmann syndrome)、急性播散性腦脊髓炎、ANCA 陽性全身壞死性脈管炎、自體免疫溶血性貧血、大水皰性天庖瘡樣病、癍痕性天庖瘡樣病、伊文氏症候群 (Evans syndrome)、母胎/新生兒同種免疫性血小板減少症 (Foeto-maternal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, FMAIT/NAIT)、噬血細胞症候群 (Haemophagocytic syndrome)、高風險同種異體造血幹細胞移植、IgM 副蛋白血症神經病 (IgM paraproteinaemic neuropathy)、腎移植、多發性硬化、眼陣攣肌陣攣運動失調、落葉型天庖瘡、尋常天庖瘡、輸血後紫癍、中毒性表

皮壞死溶解 / 史蒂芬強生症候群 (Toxic epidermal necrolysis/Steven Johnson syndrome, TEN/SJS)、中毒性休克症候群、阿滋海默氏病 (Alzheimer's Disease)、全身性紅斑狼瘡、多發性骨髓瘤、膿毒病、B細胞瘤、創傷、及細菌、病毒或真菌感染。

57.如申請專利範圍第 28 項的組合，其中該 IG 可治療性疾病或病狀係免疫缺乏症且該免疫缺乏症係選自血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症、繼發性低 γ 球蛋白血症、特異性抗體缺乏、常見變異性免疫缺乏症 (CVID)、先天無 γ 球蛋白血症、維斯科特-奧爾德裏奇症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome)、嚴重複合型免疫缺乏症 (SCID)、原發性低 γ 球蛋白血症、具有抗體缺乏之原發性免疫缺乏疾病、X-連結無 γ 球蛋白血症 (XLA)、嬰兒期低 γ 球蛋白血症、及無抗體之副腫瘤性小腦變性。

58.如申請專利範圍第 56 項的組合，其中該 IG 可治療性疾病或病狀係血液惡性腫瘤繼發之後天低 γ 球蛋白血症且該血液惡性腫瘤係選自慢性淋巴細胞性白血病 (CLL)、多發性骨髓瘤 (MM) 或非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL)。

59.如申請專利範圍第 56 項的組合，其中該 IG 可治療性疾病或病狀係發炎性肌病且該發炎性肌病係選自多發性肌炎、皮膚炎或包涵體肌炎。

60.如申請專利範圍第 56 項的組合，其中該 IG 可治療性疾病或病狀係細菌、病毒或真菌病狀且該細菌、病毒或

真菌病狀係選自 B 型流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、A 型及 B 型綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、B 群鏈球菌 (*Streptococcus*)、1 型、3 型、4 型、6 型、7 型、8 型、9 型、12 型、14 型、18 型、19 型及 23 型肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、2 型及 5 型腺病毒、細胞巨大病毒、E-B 病毒 VCA (Epstein Barr virus VCA)、A 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒、疱疹單純型病毒-1、疱疹單純型病毒-2、A 型流行性感冒、麻疹、1 型、2 型及 3 型副流行性感冒、脊髓灰質炎、水痘帶狀疱疹病毒 (*Varicella zoster virus*)、麴菌 (*Aspergillus*) 及白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

八、圖式：

無