

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4503708号
(P4503708)

(45) 発行日 平成22年7月14日(2010.7.14)

(24) 登録日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573	A
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 9/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/26	Z

請求項の数 33 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-517834	(73) 特許権者	ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 94607-5200 カリフォルニア州 オークランド トウェ ルフス フロア フランクリン ストリー ト 1111
(86) (22) 出願日	平成9年10月7日(1997.10.7)	(74) 代理人	弁理士 中島 淳
(65) 公表番号	特表2001-508646(P2001-508646A)	(74) 代理人	弁理士 加藤 和詳
(43) 公表日	平成13年7月3日(2001.7.3)	(74) 代理人	弁理士 西元 勝一
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/018089		
(87) 国際公開番号	W01998/016655		
(87) 国際公開日	平成10年4月23日(1998.4.23)		
審査請求日	平成16年9月29日(2004.9.29)		
(31) 優先権主張番号	08/733, 360		
(32) 優先日	平成8年10月17日(1996.10.17)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	08/916, 935		
(32) 優先日	平成9年8月21日(1997.8.21)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
微生物の受託番号	ATCC HB-12213		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血漿ヒアルロニダーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織、血液、血漿、血清および尿から成る群から選ばれるサンプルと抗ヒト血漿ヒアルロニダーゼ(h p H A s e)抗体とを、抗h p H A s e抗体-h p H A s e複合体を形成するのに十分な時間接触させる工程；

該サンプル中に存在するh p H A s eの量を検出する工程；及び

該サンプル中で検出されたh p H A s e量を正常レベルのh p H A s eと相関する既知量のh p H A s eを含むコントロールサンプル中のh p H A s e量と比較する工程、を有し、

前記h p H A s eが、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなるh p H A s eであって、患者から得たサンプル中のh p H A s e検出量がコントロールサンプル中のh p H A s e量未満の場合、L u C a - 1の欠陥に付随する症状を有するか又はその疑いがある患者から得たサンプルであることを示唆する、配列番号4で表されるL u C a - 1遺伝子の欠陥に付随する症状を有するか又はその疑いがある患者から得たサンプルを特定する方法。

【請求項2】

配列番号4で表されるL u C a - 1遺伝子の欠陥に付随する症状をもつ患者にヒト血漿ヒアルロニダーゼ(h p H A s e)を投与するための医薬製剤であって、

a) 治療上有効量の、精製された、少なくとも75%の純度を有するh p H A s eポリペ

プチド；および

b) 医薬上許容可能な担体、

を含有し、前記 h p H A s e ポリペプチドが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである医薬製剤。

【請求項 3】

前記 h p H A s e ポリペプチドが、ホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ D および N - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を有する脂肪酸部分を有する、請求項 2 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 4】

a) 治療上有効量の、精製された、酵素活性があるヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) ポリペプチドを含有する組成物；および

b) 医薬上許容可能な担体、

を含有する医薬製剤であって、前記 h p H A s e ポリペプチドが、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである医薬製剤。

【請求項 5】

前記 h p H A s e ポリペプチドが、少なくとも 60 % の純度を有し、ポリペプチドが通常付随するタンパク質および天然に存在する有機分子を含まず、糖付加されており、25 より高い温度で非イオン性洗剤濃厚相へ分配される、請求項 4 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 6】

前記糖付加された h p H A s e ポリペプチドが、N - グリコシダーゼ - F 処理に感受性である、請求項 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

前記糖付加された h p H A s e ポリペプチドがマンノース残基を有する、請求項 5 または請求項 6 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

前記 h p H A s e ポリペプチドが、さらに脂肪酸修飾を有する、請求項 4 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

30

【請求項 9】

前記脂肪酸修飾がホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ D、および N - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を示す、請求項 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

前記 h p H A s e ポリペプチドの酵素比活性が少なくとも 6×10^5 相対的濁度減少単位 (T R U) / m g タンパク質を示す、請求項 4 から請求項 9 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

前記 h p H A s e ポリペプチドの酵素比活性が少なくとも 2×10^5 相対的濁度減少単位 (T R U) / m g タンパク質を示す、請求項 4 から請求項 9 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

40

【請求項 12】

前記 h p H A s e ポリペプチドが S D S - P A G E 電気泳動で決定した相対分子量が 57 k D a である、請求項 4 から請求項 11 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 13】

前記 h p H A s e ポリペプチドが少なくとも 75 % の純度を有する、請求項 4 から請求項 12 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【請求項 14】

前記 h p H A s e ポリペプチドが少なくとも 90 % の純度を有する、請求項 4 から請求項

50

12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項15】

前記 h p H A s e ポリペプチドが少なくとも99%の純度を有する、請求項4から請求項12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項16】

前記 h p H A s e ポリペプチドが組換え体である、請求項4から請求項15のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項17】

前記 h p H A s e ポリペプチドが天然に存在する h p H A s e である、請求項4から請求項15のいずれか1項に記載の医薬製剤。

10

【請求項18】

前記担体がリポソームである請求項4から請求項17のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項19】

非癌性細胞のヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性のレベルと比べて低いレベルのヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性を有する癌の患者において腫瘍の成長および転移のうち少なくとも一つを抑制するための、請求項4から請求項18のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【請求項20】

皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、または腫瘍周辺内注射による投与用に製剤化されている請求項19記載の医薬製剤。

【請求項21】

前記癌が乳癌、小型肺細胞癌、有棘肺細胞癌、脳の癌、頭部の癌および頸部の癌から選ばれる請求項19記載の医薬製剤。

20

【請求項22】

配列番号4で表される L u C a - 1 遺伝子の欠陥に付随する癌の処置または予防のための組成物であって、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなる、精製されたヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) を含む組成物。

【請求項23】

前記 h p H A s e が、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDおよびN - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を有する脂肪酸部分を有し、少なくとも75%の純度を有する、請求項22に記載の組成物。

30

【請求項24】

非癌性細胞のヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性のレベルと比べて、低いレベルのヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性を有する癌の患者において腫瘍成長および転移のうち少なくとも一つを抑制するための請求項22または請求項23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項25】

非癌性細胞のヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性のレベルと比べて、低いレベルのヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性を有する癌の患者において腫瘍の成長および転移のうち少なくとも一つを抑制するための薬剤の調合における精製されたヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) の使用であって、前記 h p H A s e が、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDおよびN - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を有する脂肪酸部分を有し、少なくとも75%の純度を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなる h p H A s e である使用。

40

【請求項26】

配列番号4で表される L u C a - 1 遺伝子の欠陥に付随する癌の処置のための薬剤の調合における精製されたヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) の使用であって、前記 h p H A s e が、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDおよびN - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を有する脂肪酸部分を有し、少なくとも75%の純度を有し、配列番号1で

50

表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなる h p H A s e である使用。

【請求項27】

配列番号4で表される L u C a - 1 遺伝子の欠陥に付随する癌の処置または予防のための医薬組成物であって、ヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列およびそれに機能可能に連結した真核細胞性プロモーター配列を含有する構築物を含み、前記 h p H A s e ポリペプチドが、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなる医薬組成物。

10

【請求項28】

前記構築物がウイルスベクターである、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項29】

前記構築物が被包化されていない構築物である、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項30】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項28に記載の医薬組成物。

【請求項31】

非癌性細胞のヒト血漿ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) 活性のレベルと比べて、低いレベルのヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性を有する癌の患者において腫瘍の成長および転移のうち少なくとも一つを抑制するための医薬組成物であって、h p H A s e ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列およびそれに機能可能に連結した真核細胞性プロモーター配列を含有する構築物を含み、前記 h p H A s e ポリペプチドが、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるか、または配列番号1で表されるアミノ酸配列をアミノ酸置換、欠失、または付加により改変したアミノ酸配列であって、ヒアルロニダーゼ活性を有するアミノ酸配列からなる医薬組成物。

20

【請求項32】

皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、または腫瘍周辺内注射による投与用に製剤化されている請求項31記載の医薬組成物。

30

【請求項33】

前記癌が乳癌、小型肺細胞癌、有棘肺細胞癌、脳の癌、頭部の癌および頸部の癌から選ばれる請求項31記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

関連出願との相互参照

本願は、米国特許出願第08/733360号（1996年10月17日出願、該出願は参照により本明細書に含まれる）の一部継続出願である。

合衆国連邦政府支援研究または支援開発に関する記述

本発明は、アメリカ予防衛生研究所のグラントCA44768号、CA58207号およびGM46765号の下、政府の支援を受けて達成された。合衆国政府は本発明に関して一定の権利を有するであろう。

40

発明の分野

本発明は、一般に -1,4-エンドグリコシダーゼ類、特にヒアルロニダーゼ類に関する。

発明の背景

ヒアルロニダーゼ (H A s e) 類 (E . C . 3 . 1 . 2 5) は、微生物 (例えばストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes)、トレポネーマ・パラジウム (Treponema palladium) および線虫)、ミツバチ、ジガバチ、スズメバチ、クモ、サソリ、魚類、ヘビ、トカゲおよび哺乳類のような多様な生物において動物界全体で見出される、中性活性および酸活性の酵素である。ヒアルロニダーゼ類はヒアルロン (H A ; ヒアルロン酸としても知られている) を分解し、さらに分解度は低いがコンドロイチン硫酸も分解する (概説

50

として、Kreilら、Protein Sci.,4:1666-9 (1995)を参照のこと)。脊椎動物のヒアルロニダーゼ類は大きく2つの種類に分けられる。1)中性ヒアルロニダーゼ、例えば主に精液関連タンパク質PH20(Liuら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:7832-7(1996);Primakoffら、J.Cell Biol.,101:2239-44(1985);Liuら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:10071-5(1993));および2)酸活性ヒアルロニダーゼ、これはpH3.5~4.0で明瞭な最適pHを示し、以下の臓器の抽出物で報告されている。肝臓(Fischer-Szafarzら、Acta Biochim Pol.,42:31-3(1995))、腎臓(Komenderら、Bull.Acad.Pol.Sci.[Biol.]21:637-41(1973))、肺臓(Thetら、Biochem.Biophys.Res.Commun.,117:71-7(1983))、脳(Margolisら、Neurochem.,19:2325-32(1972))、皮膚(Cashmanら、Arch.Biochem.Biophys.,135:387-95(1969))、胎盤、マクロファージ、線維芽細胞(Lienら、Biochim Biophys.Acta,1034:318-25(1990);Ruggieroら、J.Dent.Res.,66:1283-7(1987))、尿(Fischer-Szafarzら、上掲書)およびヒト血漿(De Saieguiら、Arch.Biochem.Biophys.,120:60-67(1967))。酸活性ヒアルロニダーゼ活性はまたホ乳類の血清でも報告されているが、いくつかの種では検出可能な活性は全く示されなかった(Fischer-Szafarzら、Biol.Cell,68:95-100(1990);De Saieguiら、(1967)上掲書)。

ヒアルロナン、ヒアルロニダーゼの主要基質は、 $[GlcNAc\ 1-4GlcUA\ 1-3]_n$ の繰り返し二糖類で、インビボでは高分子直鎖多糖類として存在する。ヒアルロニダーゼによるヒアルロナンの分解は、 β -N-アセチル-ヘキソサミン-[1-4]-グリコシド結合での切断または β -グルコノレート-[1-3]-N-アセチルグルコサミン結合での切断のいずれかによって達成される。

ヒアルロナンはホ乳類の主に結合組織、皮膚、軟骨および滑液で見出される。ヒアルロナンはまた目の硝子体の主要な構成成分である。結合組織では、ヒアルロナンに結合している水和水が組織間に空隙を作りだし、したがって細胞運動および細胞増殖に役立つ環境を造る。ヒアルロナンは、迅速な成長、再生、修復、胚形成、胚の発育、創傷治癒、脈管形成、および腫瘍形成を含む細胞の自動運動性に付随する生物学的現象に中心的役割を果たす(Toole,Cell Biol.Extracell.Matrix,Hay編、Plenum Press刊、New York、1384-1386(1991);Bertrandら、Int.J.Cancer,52:1-6(1992);Knudsonら、FASEB J.,7:1233-1241(1993))。さらに、ヒアルロナンレベルは腫瘍の攻撃性と相関する(Ozelloら、Cancer Res.,20:600-604(1960);Takeuchiら、Cancer Res.,36:2133-2139(1976);Kimataら、Cancer Res.,43:1347-1354(1983))。

ヒアルロニダーゼは、ヒアルロナン過剰を伴う疾患処置の治療薬として、さらに生理的液体の循環の強化のために、および/または投与部位での治療薬剤として有用である。例えば、ヒアルロニダーゼを用いて、硝子体液内のヒアルロナンの分解を通して緑内障患者の目の眼圧を低下させている(USPN 4,820,516号、1989年4月11日発行)。ヒアルロニダーゼはまた、化学療法剤の活性を高めるために、および/または腫瘍を化学療法剤にアクセスさせ易くするために“分散剤”として癌治療において用いられている(Schullerら、Proc.Amer.Assoc.Cancer Res.,32:173(1991)、アブストラクト番号1034;Czejkaら、Pharmazie,45:H.9(1990))。さらにヒアルロニダーゼは、膀胱癌(Hornら、J.Surg.Oncol.,28:304-307(1985))、有棘細胞癌(Kohnoら、J.Cancer Res.Oncol.,120:293-297(1994))、乳癌(Beckenlehnerら、J.Cancer Res.Cocol.,118:591-596(1992))および胃腸系癌(Scheithauerら、Anticancer Res.,8:391-396(1988))を含む多様な治療で他の化学療法剤と組み合わせて用いられている。また、ヒアルロニダーゼの投与により、以前に化学療法耐性であった膵臓、胃、大腸、卵巣、乳房の腫瘍の応答性が誘発される(Baumgartnerら、Reg.Cancer Treat.,1:55-58(1988);Zankerら、Proc.Amer.Assoc.Cancer Res.,27:390(1986))。血清ヒアルロニダーゼは、マウスに移植した腫瘍の増殖を防止する(De Maeyerら、Int.J.Cancer,51:657-660(1992))一方、ヒアルロニダーゼを注射することにより、発癌剤暴露によって惹起される腫瘍形成が抑制される(Pawlowskiら、Int.J.Cancer,23:105-109(1979);Habermanら、第17回アメリカ臨床腫瘍学会総会議事録(Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology)、ワシントンD.C.,22:105(アブストラクト番号415))。ヒアルロニダーゼの静脈内注射ま

10

20

30

40

50

たは筋肉内注射は脳腫瘍（神経膠腫）の治療に有効である（PCT公開出願W088/02261号、1988年4月7日公開）。

ヒアルロニダーゼの発現、およびヒアルロンレベルは、腫瘍の発生と進行に関係を有する。卵巣（Miuraら、*Anal. Biochem.* 225:333-40（1995））、前立腺（Lokeshwarら、*Cancer Res.* 56:651-7（1996））、脳、メラニン細胞、および大腸（Liuら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7832-7837（1996））に由来する癌腫で分泌された中性ヒアルロニダーゼ活性のレベルは正常組織のものより高い。この分泌中性ヒアルロニダーゼ活性は、精子ヒアルロニダーゼPH20の中性ヒアルロニダーゼ活性と類似しているかまたは同一であるらしい。中性活性とは対照的に、酸活性の血清ヒアルロニダーゼ活性は、肺臓、乳房および大腸の転位性癌では顕著に減少する（Northrupら、*Clin. Biochem.* 6:220-8（1973）；Kolarovaら、*Neoplasma*, 17:641-8（1970））。さらに、低レベルの血清ヒアルロニダーゼ活性に付随するhyal-1対立遺伝子座をもつマウスは、3倍高いヒアルロニダーゼ活性レベルを付随するhyal-1対立遺伝子座をもつマウスより速い移植腫瘍増殖速度を示す（Fischer-Szafarzら、*Somat. Cell. Mol. Genet.* 15:79-83（1989）；De Maeyerら、上掲書）。

現時点で、臨床用途のために利用できる唯一のヒアルロニダーゼ活性は、ウシの精巣抽出物から単離されたヒアルロニダーゼ（WYDASE（登録商標）、Wyeth-Ayerst製）である。ウシの抽出物は、それが非ヒト由来であるだけでなく抽出物が多数のタイプのヒアルロニダーゼおよび未特定の他の成分を含んでいるために最適ではない。ヒト血清中の酸活性ヒアルロニダーゼ活性は投与に好ましいであろうが、このヒアルロニダーゼはこれまで単離または精製されたことがない。これまでの研究では血清中の酸活性のヒアルロニダーゼ活性は、血漿中のヒアルロニダーゼ活性が血清で見出されたものに匹敵するので、血小板の成分ではないと決定できたが、ヒト血清からのこの酸活性ヒアルロニダーゼ活性を単離する試みは、一部には精製活性の安定性のため、および適度に高い比活性を得ることが困難なため、成功は限られていた。免疫精製の試みは、血漿中の天然形の活性と特異的に結合する抗体を同定し単離することができないために妨げられている。通常のELISA技術によって特定されるモノクローナル抗体はELISAスクリーニングアッセイで変性ヒト血漿ヒアルロニダーゼと結合し、天然の折り畳まれた構造のタンパク質とは結合しない（Harrisonら、*J. Reprod. Fertil.* 82:777-85（1988））。

ヒアルロニダーゼ活性のための通常の方法にはELISA様アッセイが含まれる（Delpechら、*J. Immunol. Methods*, 104:223-9（1987）；Sternら、*Matrix*, 12:397-403（1992）；Afifyら、*Arch. Biochem. Biophys.* 305:434-41（1993）；Reissigら、*J. Biol. Chem.* 217:956-966（1955））。このアッセイでは、ヒアルロニダーゼを含むサンプルを、ヒアルロンまたはヒアルロネクチンを非共有結合によってその表面に結合させたマイクロタイター盤のウェルに塗布する。サンプル中に存在するHASEはHA基質を分解する。続いてプレートを洗浄し、残余のHA基質についてプレートを検査してHASE活性を検出する。

ヒアルロニダーゼ活性は、基質ゲルザイモグラフィーによっても検出できる（Guentenhoneraら、*Matrix*, 12:388-396（1992））。このアッセイでは、サンプルはヒアルロンを含むSDS-PAGEゲルに適用され、サンプル中のタンパク質を電気泳動によって分離する。続いてゲルを酵素アッセイ緩衝液中でインキュベートし、その後で染色してゲル中のヒアルロニダーゼ活性を検出する。ヒアルロニダーゼ活性は基質ゲル中に鮮明なゾーンとして可視化される。

ヒアルロニダーゼ活性を検出するのこれらの従来の方法は、検出可能に標識化したヒアルロン酸基質を製造することの難しさ、および迅速で高感度でさらに再現性を有するヒアルロニダーゼ活性検出を達成する技術的困難の双方によって妨げられている。例えば、ELISA様アッセイで使用するヒアルロン酸のビオチン標識は、HAが遊離アミノ基、即ち活性化ビオチンが共有結合する部分を含まないため、ビオチン付加には不向きであることが分かった。この問題を解決しようとする従来試みは、ウシ鼻軟骨由来のビオチン付加HA結合アグリカン（aggrecan）ペプチドを用いることに集中していた（Levyら、*Method Enzymol.* 8:571-584（1966））が、この方法は単調で時間のかかる工程を必要とする。さらに、従来ヒアルロニダーゼアッセイは、HA基質がプレート表面に非共有結合によ

10

20

30

40

50

って結合したアッセイプレートを使用するが、これは偽陽性および偽陰性結果をもたらす可能性がある。HA基質はプレート表面に非共有結合によって結合されるので、HAse含有サンプルにプレートを暴露した後の洗浄工程でしばしばプレート上の非分解HA基質の非特異的除去が生じる。したがって、従来のヒアルロニダーゼアッセイの感度は高くない。ゲルザイモグラフィーを用いるHAse活性は、ELISA様アッセイに伴うこの問題を回避することができるが、時間がかかり（例えばテストサンプルとHA含有ゲルを通常約18~24時間インキュベートする）、ゲルに過剰なタンパク質サンプルが適用されると人工産物を生じる可能性がある。さらにまた、粗調製物の分析はゲルザイモグラフィーでは不可能である。

したがって、好ましい酸活性血漿ヒアルロニダーゼ活性が存在するにもかかわらず、さらにヒトの血液と同じように貴重で希少な資源から得られる一切の有用な成分を得ようとするヒト血液製剤メーカーの経済的動機にもかかわらず、この酸活性ヒアルロニダーゼ活性を含むヒト血漿分画は、その単離と精製に許容可能な方法が無いために廃棄されている。化学療法におけるヒアルロニダーゼの価値を考えれば、ヒト血清中の酸活性ヒアルロニダーゼ活性と結びついたポリペプチドを同定し単離する方法が当分野で切望されている。

発明の要旨

本発明は、ヒト血漿で見出される酸活性ヒアルロニダーゼ(hpHAse)の精製方法の発見に基づいており、該方法は生化学的精製法および免疫親和性精製法の双方を含む。本発明の免疫親和性精製法は、天然のhpHAseと特異的に結合する抗体(抗天然hpHAse抗体)を同定する方法、およびこのスクリーニング方法によって同定される抗天然hpHAse抗体の発見に基づいている。本発明の特徴はまた、ビオチン付加ヒアルロン酸(bHA)を用いる感度の高いHAse活性の検出アッセイである。hpHAseの精製および性状決定によって、発明者らは、hpHAseはLuCa-1遺伝子によってコードされるという新たな発見に到達した。この遺伝子はヒト染色体の3p21.3、即ち腫瘍抑制に関連する領域に位置する。

したがって、ある面として、本発明は、不溶性支持体および該支持体に共有結合させたビオチン付加ヒアルロン酸(bHA)を有するヒアルロニダーゼ活性検出アッセイ装置に特徴を有する。好ましくは、bHAはヒアルロン酸、1-エチル-ジメチルアミノプロピルカルボジアミド(EDC)およびビオチンヒドラジドの一工程反応で調製される。好ましい態様として、bHAは、ヒアルロン酸部分の二糖類100単位毎に少なくとも1つのビオチン部分を含み、bHAは、ヒアルロン酸部分の二糖類50単位毎に少なくとも1つの共有結合によって支持体に共有結合されている。

他の面として、本発明は、サンプルから天然の酸活性ヒアルロニダーゼ(aaHAse)を精製する方法に特徴を有する。本方法は以下の工程を有する。(a) aaHAseを含んでいると思われるサンプルを、実質的に室温より低温の溶液であって非イオン性洗剤を含有する溶液に溶かす；(b) 溶液の温度を実質的に室温より高温に上昇させ、温度上昇によってaaHAseを含有する洗剤濃厚相および洗剤希薄相を形成し；さらに(c) 当該洗剤濃厚相からaaHAseを単離する。aaHAseはhpHAseであるのが好ましく、工程(a)~(c)を2度繰り返すのが好ましい。

また、他の面として、本発明は、天然のaaHAseとの結合に関して候補抗体をスクリーニングする方法に特徴を有し、以下の工程を有する。(a) 候補抗体を天然のaaHAseを含有するサンプルと、抗体-aaHAse複合体を形成するのに十分な時間、インキュベートし；(b) 抗体及びそれに検出可能な標識化したヒアルロン酸を有する不溶性支持体にサンプルを、抗体-候補抗体-hpHAse複合体を形成するために十分な時間、接触させ；さらに(c) 支持体に接触させているサンプルを酸性pH約3.4~3.7に曝露し、それによって抗体-aaHAse複合体中のhpHAseにより検出可能に標識化したヒアルロン酸を分解させる。ここでヒアルロン酸分解を伴うサンプルは抗aaHAse抗体を含有する。これに関連する面として、本発明は、抗天然hpHAse抗体、そのような抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系、および抗hpHAse抗体を結合させたhpHAseの免疫精製用および/または検出用アッセイ装置に特徴を有する。

10

20

30

40

50

また他の面として、本発明は、サンプルから h p H A s e を精製する方法に特徴を有し、該方法は、h p H A s e を含有するサンプルを抗 h p H A s e 抗体と接触させることを有する。好ましい態様として、サンプルはヒト血液、血清、血漿もしくは尿であり、または h p H A s e が組換え h p H A s e である。

さらに他の面として、本発明は、ホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ D および N - グリコシダーゼ - F による切断に耐性を有する脂肪酸部分により特徴づけられる実質的に精製された天然の h p H A s e に特徴を有する。これに関連する面として、本発明は、天然 h p H A s e、特にリポゾーム製剤を含有する製剤である。

さらに他の面として、本発明は、組換えによって h p H A s e を発現させる方法に特徴を有する。本発明の組換え発現系は、h p H A s e の工業的製造および治療的用途で使用する h p H A s e の製造に適した高レベルでの分泌 h p H A s e を提供する。これに関連する面として本発明は、組換え h p H A s e および組換え h p H A s e の製造方法に特徴を有する。

さらに関連する面として、本発明は、ヒアルロニダーゼ投与が所望される症状を有するか、またはその疑いがある患者を処置する方法である。具体的な態様として、本発明は、不完全な h p H A s e 発現に関連する癌をもつかまたは癌の疑いがある患者にヒト血漿ヒアルロニダーゼを投与することに特徴を有し、h p H A s e ポリペプチドを患者に腫瘍増殖を抑制するのに有効な量投与することを含む。さらなる態様として、本発明は、心筋梗塞発症後の患者またはリソソーム貯蔵系疾患を罹患している患者を処置する方法に特徴を有する。

本発明は、他の面として、不完全な L u C a - 1 遺伝子に関連する癌をもつかまたは癌の疑いがある患者を処置する方法を特徴とする。本方法は、ヒト血漿ヒアルロニダーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列およびそれらに機能可能に連結した真核細胞性プロモーター配列を有する構築物を患者の細胞に導入し、それによって該ヌクレオチド配列が h p H A s e を発現できるように該細胞を遺伝的に形質転換させることを有する。

本発明はまた、不完全なヒト血漿ヒアルロニダーゼ活性に関連する症状をもつかまたはその疑いがある患者を同定する方法に特徴を有する。本方法は、該患者の血漿サンプルを抗天然ヒト血漿ヒアルロニダーゼ抗体と接触させ、その酵素と抗体との複合体を検出する工程を含む。

本発明の主要な目的は、精製ヒアルロニダーゼ (h p H A s e) を提供することである。精製ヒアルロニダーゼは、癌治療、特に腫瘍抑制遺伝子 L u C a - 1 の欠陥に関連する癌治療を含む様々な臨床治療に用いることができる。

本発明の利点は、精製 h p H A s e が現在利用可能な市販ヒアルロニダーゼ製剤より治療的利用により適しているということである。この市販ヒアルロニダーゼは、非ヒト由来であり、(1 種ではなく) 2 種のヒアルロニダーゼを含み、S D S - P A G E 分析で測定すると、極めて不純な混合物で、多様なタンパク質を含有する。これら多様なタンパク質には、数種の未同定タンパク質および抗凝固活性を含む種々の生物学的活性を有するタンパク質 (Doctorら、Thrombosis Res., 30:565-571) が含まれる。精製 h p H A s e は、“清浄”なヒアルロニダーゼ供給源を提供し、現在利用できる市販の製剤に付随する副作用のいくつかを誘発する可能性が少なく、さらに特定の用量と結びついた活性レベルの制御を容易にする。

本発明の別の利点は、現在の工業的製造では廃棄される血漿の脂質分画から h p H A s e を精製することができることである。

本発明の H A s e アッセイの利点は、従来の E L I S A 様アッセイよりも少なくとも 1000 倍感度が高い H A s e 活性のアッセイを提供することにある。さらに、本発明は、容易かつ効率的に調製できるビオチン付加ヒアルロン酸を提供する。

本発明の抗天然 a a H A s e アッセイの利点は、天然の a a H A s e と結合する抗体の迅速なスクリーニングを提供することにある。

本発明の別の利点は、h p H A s e を特異的に検出することにより、L u C a - 1 発現および L u C a - 1 欠陥に関連する疾患 (例えば小細胞型肺細胞癌のような癌) に対する感

10

20

30

40

50

受性を有する患者の血清もしくは尿中 h p H A s e レベルと該疾患との相関性を測定する特異的な手段が可能となることである。

本発明のこれらの目的および他の目的、並びに特徴は、以下にさらに完全に記述する本発明の詳細を通読するにしたがって当業者には明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

図1は、ビオチン付加 H A の共有結合のための表面の化学的物理的構造を示す模式図である。

図2は、ビオチン付加 H A の化学構造を示す模式図である。

図3は、本発明の抗天然酸活性 H A s e 抗体アッセイの工程を示す模式図である。

図4は、種々の濃度の抗天然 h p H A s e 1 7 E 9 抗体（白丸）または結合コントロール抗体（白四角）で免疫沈澱させた後のヒト血漿の上清に付随するヒアルロニダーゼ活性を示すグラフである。

10

図5は、L u C a - 1 の推定アミノ酸配列（配列番号：3）と天然の H A s e P H 2 0 のアミノ酸配列（配列番号：11）との整合を示す模式図である。同一のアミノ酸残基は黒地で示す。

図6は、L u C a - 1 / h p H A s e のハイドロパシー・プロットである。

図7Aは、L u C a - 1 発現 c o s - 7 細胞と条件付け培養液（黒塗り棒）および偽トランスフェクト細胞と条件付け培養液（白棒）の洗剤抽出物の酸活性 H A s e 活性を示すグラフである。

図7Bは、L u C a - 1 発現 H e k 2 9 3 細胞と条件付け培養液（黒塗り棒）および偽トランスフェクト細胞と条件付け培養液（白棒）の洗剤抽出物の酸活性 H A s e 活性を示すグラフである。

20

図8は、ヒト血漿（白四角と実線）、c o s - 1 細胞で発現させた組換え L u C a - 1 （黒四角と点線）、および V I - S 型精巢ヒアルロニダーゼ（黒丸と点線）から精製した h p H A s e の H A s e 活性の最適 p H を示すグラフである。

図9は、正常なヒトケラチノサイト及び幾つかの癌細胞系の細胞層及び条件付け培養液での h p H A s e の発現を示すグラフである。

図10は、H S C - 3 頭部および頸部有棘細胞癌細胞の動物モデルでの成長に対する h p H A s e の腫瘍周囲への注射の効果を示すグラフである。

図11は、動物モデルでの腫瘍成長に対する形質転換 H S C - 3 細胞の h p H A s e 発現の効果を示すグラフである。

30

図12は、動物モデルでの悪液質に対する形質転換 H S C - 3 細胞の h p H A s e 発現の効果を示すグラフである。

好ましい態様の詳細な説明

本発明の精製ヒアルロニダーゼおよびそれをコードする D N A について述べる前に、本発明は、記載されている特定の方法、プロトコル、細胞株、ベクターおよび試薬そのものに限定されず、もちろん変更可能であることを理解すべきである。さらにまた、本明細書で使用する用語は、具体的な態様を説明することを目的としており、本発明の範囲を限定しようとするものではないことを理解すべきである。本発明の範囲は添付の請求の範囲によってのみ限定されるであろう。

40

本明細書および添付の請求の範囲で用いるとき、不定冠詞 " a " および定冠詞 " the " の単数形は、文脈が明らかに別のものを指す場合を除いて複数の対象物を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば " 1 個のヒアルロニダーゼをコードする D N A を含む 1 個の形質転換細胞 " といえ、複数のそのような細胞を含み、" 1 個の該形質転換ベクター " といえ、1 つまたは 2 つ以上の形質転換ベクターおよび当業者に既知の複数のその均等物を含む等々である。

特記しない限り、本明細書で使用される全ての技術的および学術的用語は、本発明が属する分野の通常の技術を有する者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載したものと類似または均等のいずれの方法、装置および材料も本発明の実施または試験で用いることができるが、好ましい方法、装置および材料をこれから述べる。

50

本明細書に記載する全ての刊行物は、本発明に関連して用いることが可能な当該文献に記載されている細胞系、ベクターおよび方法を説明し開示する目的のために参照として本明細書に含まれる。

定義

“酸活性ヒアルロニダーゼ”または“*aaHase*”とは、ヒアルロナンの切断で -1,4-エンドグリコシダーゼ活性を有し、かつ*Hase*活性の最適pHが約pH3.7であるヒアルロニダーゼを意味する。本明細書で使用される*aaHase*はヒト血漿ヒアルロニダーゼを含む。

“ヒト血漿ヒアルロニダーゼ”、“ヒト血漿酸活性ヒアルロニダーゼ”および“*hpHase*”とは、ヒト血漿に天然に見出され、以下の特性を有するヒアルロニダーゼを意味する。1) ヒアルロンの切断で -1,4-エンドグリコシダーゼ活性；2) *Hase*活性における最適pHが約pH3.7；3) 12.5% SDS - PAGE非還元型ゲル電気泳動で決定した分子量が約57kDa；4) 酵素比活性が約 2×10^5 から 8×10^5 濁度減少単位 (turbidity reducing unit (TRU)) / mg精製後タンパク質；5) モノ-P f.p.l.c.上でクロマトフォーカシングで溶出して決定したとき等電点がpH6.5；6) 温度誘発洗剤相抽出でトリトンX - 114洗剤濃厚相へ分配される；7) ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼD、およびN - グリコシダーゼ - Fによる切断に耐性を示す脂肪酸翻訳後修飾 (例えば脂質アンカー)；8) 少なくとも2つのN-連結糖付加部位；および9) 下記のアミノ酸配列 (配列番号：1) を有すること；

MAGHLLPICALFLTLDDMAQGRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGV

DVDVSVFDVVANPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPYYTPTGEPVFGGLPQN

ASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQ

RSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGGALRPRG

LWGFYGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSI

YMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTN

HFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTL

GPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVRRRTSHPKALLLNPAFSIQLTPGGG

PLSLRGALSLEDQAQMAVEFKRCRCYPGWQAPWCERKSMW (配列番号：1)

式中、MAGHLLPICALFLTLDDMAQG (配列番号：2) は、翻訳後修飾時に切断されるシグナル配列である。本明細書で使用される“*hpHase*”は、天然に存在する*hpHase*のアミノ酸配列を有する*hpHase*ポリペプチドとともに、アミノ酸置換、欠失および/または付加 (例えば融合タンパク質) などにより、天然に存在するアミノ酸配列に対して改変されている*hpHase*を包含する。“*hpHase*”は、生物学的に活性な (例えば抗*hpHase*抗体と結合し、および/またはヒアルロニダーゼ活性を示すことができる) *hpHase*ポリペプチドを包含するのが好ましい。

“*hpHase*の尿型”または“尿*hpHase*”とは、ヒトの尿中に見出され、以下の特性を有する*hpHase*の形態を意味する。1) ヒアルロンの切断で -1,4-エンドグリコシダーゼ活性；2) *Hase*活性における最適pHが約pH3.7；3) 12.5% SDS - PAGE非還元型ゲル電気泳動を用いるゲルザイモグラフィで決定したとき分子量が約57kDa；4) LuCa - 1に特異的な抗天然*hpHase*モノクローナル抗体で免疫沈澱；5) モノ-P f.p.l.c.上でクロマトフォーカシングで溶出して決定したとき等電点がpH6.5；及び6) 温度誘発洗剤相抽出でトリトンX - 114洗剤濃厚相へ分配される。

“天然*hpHase*”とは、その天然に存在する構造で折り畳まれた (すなわち*hpHase*は変性していない) *hpHase*を意味する。天然の*hpHase*が天然に存在する

10

20

30

40

50

h p H A s e の完全なアミノ酸配列（配列番号：1）を含まない場合、天然の h p H A s e ポリペプチドは、折り畳まれたときに、天然の h p H A s e と結合する抗体が該 h p H A s e ポリペプチドと結合するように天然の完全長の h p H A s e の三次元エピトープに極めて類似するポリペプチドである。“天然の h p H A s e”は、ヒトの血漿、血液、血清および尿中に天然に見出される h p H A s e、並びに組換えによって（例えばホ乳類細胞での発現によって）産生される h p H A s e の双方を包含する。

“ポリペプチド”とは、長さに関係なく、又は翻訳後修飾（例えば糖付加、リン酸化または脂肪酸鎖の修飾）に関係なく、一切のアミノ酸の鎖を意味する。

“実質的に純粋なポリペプチド”とは、該ポリペプチドに天然に付随する成分から分離されたポリペプチドを意味する（例えば、ヒトの血漿から精製した実質的に純粋な p h H A s e ポリペプチドは、ヒト血漿に通常付随する成分を実質的に含まない）。典型的には、ポリペプチドは、少なくとも60重量%のときに実質的に純粋であり、該ポリペプチドに通常付随するタンパク質および天然に存在する有機分子を実質的に含まない。好ましくは、調製物は、h p H A s e ポリペプチドが少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、最も好ましくは少なくとも99重量%である。実質的に純粋な h p H A s e ポリペプチドは、例えば天然の供給源（例えばホ乳類の血漿、好ましくはヒト血漿）からの抽出によって；h p H A s e をコードする組換え核酸の発現によって；または該タンパク質を化学的合成することによって得ることができる。純度は、適切ないずれかの方法、例えばクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはH P L C分析によって測定できる。

タンパク質は、天然の状態に該タンパク質に付随する不純物から分離されているとき、天然に付随する成分を実質的に含まない。したがって、化学的に合成されたタンパク質、または天然にそれが生成される細胞とは異なる細胞系で産生されるタンパク質は、それに天然に付随する成分を実質的に含まないであろう。したがって、実質的に純粋なポリペプチドは、真核生物に由来するものだけでなく、大腸菌または他の原核細胞で合成されたポリペプチドを含む。

“抗体”とは、抗原と結合できる免疫グロブリンペプチドを意味する。本明細書で使用される抗体には完全な抗体、並びに問題のエピトープ、抗原または抗原フラグメントと結合できる一切の抗体フラグメント（例えばF (a b ')₂、F a b '、F a b、F v）を含む。本発明の抗体は、天然 h p H A s e ポリペプチドに対して免疫応答性または免疫特異的であるため、該天然 h p H A s e と特異的かつ選択的に結合する。抗 h p H A s e 抗体は好ましくは免疫特異的である（すなわち、関連物質と実質的に交差反応性をもたない）。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナルである。

“特異的に結合する”とは、特異的ポリペプチド、即ち h p H A 抗体のエピトープとの抗体の高いアビディティ結合および/または高い親和性結合を意味する。この特異的ポリペプチド上での抗体とそのエピトープとの結合は、好ましくは同じ抗体と他の一切のエピトープとの結合（特にサンプルに付随するかまたは同じサンプル中の分子に存在するエピトープ）よりも強い。なぜならば、例えば問題の特異的ポリペプチドはヒト血漿中の他の成分よりも h p H A s e とより強力に結合するからである。問題のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、弱いながら検出可能なレベル（問題のポリペプチドに対して示される結合の例えば10%またはそれ未満）で結合することが可能であろう。そのような弱い結合またはバックグラウンド結合は、問題の化合物またはポリペプチドと結合する特異的な抗体と、例えば適切なコントロールの使用によって、容易に判別できる。一般に、10⁷リットル/モルまたはそれ以上、好ましくは10⁸リットル/モルまたはそれ以上、さらに好ましくは10⁹ l /モルまたはそれ以上の結合親和性で天然の h p H A s e と結合する本発明の抗体は h p H A s e と特異的に結合すると言える。一般に、10⁴ l /モルまたはそれ未満の結合親和性をもつ抗体は、現在用いられる通常の方法で検出できるレベルで抗原と結合しないということでは有用ではない。

“抗天然 h p H A s e 抗体”または“抗 h p H A s e 抗体”とは、天然の（非変性）h p

10

20

30

40

50

H A s e と特異的に結合する抗体を意味する。好ましくは、そのような抗体を用いて、ヒトの血漿および/または例えばホ乳類細胞によって発現された組換え h p H A s e から天然に存在する h p H A s e を (例えば免疫沈澱または免疫親和性カラムクロマトグラフィーによって) 免疫精製することができる。

“機能可能に連結された”とは、適切な分子(例えば転写アクチベータータンパク質)が調節配列に結合し、したがって例えば h p H A s e ポリペプチド、組換えタンパク質、または R N A 分子の産生を促進するとき問題の D N A の遺伝子発現を可能にする態様で、その問題の D N A (例えば h p H A s e ポリペプチドをコードする D N A) および調節配列が連結されることを意味する。

“形質転換”とは、新規な D N A (すなわち当該細胞にとって外因性 D N A) の取り込み 10 に続いて細胞内で誘発される永久的な遺伝的変化を意味する。細胞がホ乳類細胞の場合、永久的な遺伝的変化は一般に、その D N A を細胞ゲノム内に導入することによって達成される。

“ベクター”とは、本発明の h p H A s e ポリペプチドをコードする D N A による宿主細胞の形質転換を促進する一切の生物学的または化学的合成物を意味する。

“実質的に同一”とは、ポリペプチドまたは核酸が、参照アミノ酸配列または核酸配列に対して少なくとも50%、好ましくは85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%の相同性を示すことを意味する。ポリペプチドについては、比較配列の長さは一般に、少なくとも16アミノ酸、好ましくは少なくとも20アミノ酸、より好ましくは少なくとも25アミノ酸、最も好ましくは35アミノ酸であろう。核酸については、比較配列の長さは、一般に少 20 なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、最も好ましくは110ヌクレオチドであろう。

配列同一性は典型的には配列分析ソフト(配列分析ソフトは、例えば Wisconsin 大学、バイオテクノロジー・センターのジネティクス・コンピュータ・グループ (Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, マジソン、ウィスコンシン州、53705) による配列分析ソフトウェア (Sequence Analysis Software Package)) を用いて測定される。そのようなソフトは、種々の置換、欠失、およびその他の変更に対して相同性の度合いを決定することによって類似の配列を整合させる。典型的には、保存的置換は以下のグループ内の置換を含む。グリシン、アラニン; パリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン 30 、グルタミン; セリン、スレオニン; リジン、アルギニン; およびフェニルアラニン、チロシン。

“処置”及び“処置する”という用語は、一般に所望の薬理的および/または生理学的効果を得ることを意味するのに本明細書では使用される。この効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという意味で予防的であってもよく、並びに/または、疾患及び/もしくはその疾患をもたらす有害な作用を部分的または完全に治癒させるという意味で治療的であってもよい。本明細書で使用される“処置”とは、ホ乳類、特にヒトの疾患の一切の処置を包含し、これには (a) ある疾患(例えば癌)に罹患する傾向を有するが未だ罹患していると診断されていない対象者で当該疾患の発生を防止すること; (b) 該疾患を抑制すること、即ちその進行を停止させること; または (c) 該疾患を緩和 40 させること、即ち該疾患を退行させること(例えば腫瘍容積の減少、悪液質の鈍化)が含まれる。本発明は、L u C a - 1 遺伝子 (h p H A s e をコードする遺伝子) 欠陥に付随する癌を有するか、またはその疑いのある患者の処置に関する。

“治療上有効量の実質的に純粋な h p H A s e ポリペプチド”とは、所望の治療効果を促進させるのに有効な、実質的に純粋な h p H A s e ポリペプチドの量を意味する。所望する正確な治療効果は処置すべき症状にしたがって変化するであろう。例えば、ヒアルロナンの所望の分解は、過剰ヒアルロナン、不所望の細胞運動性(例えば腫瘍細胞の転移)に付随する症状の処置において、および/または投与部位の生理的液体の循環を強化させるために、および/または腫瘍成長または進行を抑制するために、患者に h p H A s e が投与される場合に所望される治療効果である。L u C a - 1 欠陥に関連する癌をもつかまた 50

はその疑いがある患者を処置するのに h p H A s e が投与される場合、望ましい治療効果の1つには、腫瘍細胞の成長抑制およびアポプトシスに対する腫瘍細胞の閾値の低下（すなわちプログラムされた細胞死の引き金となるものへの細胞の感受性の増強）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。h p H A s e の治療効果は、h p H A s e のヒアルロニダーゼ活性、コンドロイタナーゼ活性またはその両方に付随しているであろう。

“ L u C a - 1 欠陥 ” または “ h p H A s e 欠陥 ” とは、細胞の染色体3p.21.3部位における遺伝的欠陥を意味する。この欠陥は、正常細胞の h p H A s e 活性レベルと比較して h p H A s e 活性レベルの低下、および/または罹患患者の血清または血漿中の h p H A s e 活性レベルの低下（例えば h p H A s e 発現の低下または欠陥 h p H A s e の発現のため）を伴う。“ L u C a - 1 欠陥 ” または “ h p H A s e 欠陥 ” はまた、罹患患者の血清または血漿中の h p H A s e 活性レベルの低下を伴う細胞性欠陥（例えば h p H A s e の血流中への輸送における欠陥）も包含する。例えば、L u C a - 1 欠陥に関連する肺癌をもつ患者由来の血漿は、通常の患者（すなわち L u C a - 1 欠陥に関連する癌をもたない患者）の血漿より約50%未満の h p H A s e 活性を示す。健常人の血漿は、本発明の H A s e アッセイを用いて測定したとき、h p H A s e 活性が約15 r T R U / m g を示す。L u C a - 1 欠陥に関連する肺癌患者の血漿の h p H A s e 活性は約7.5 r T R U / m g である。

“ L u C a - 1 欠陥に関連する症状をもつか、またはその疑いがある ” とは、L u C a - 1 遺伝子座におけるヘテロ接合型、ホモ接合型または後成型 (epigenetic) 欠陥を有するか、および/または通常の患者（すなわち h p H A s e レベルの変化をもたらす L u C a - 1 欠陥をもたない患者）の h p H A s e レベルと較べて h p H A s e レベル（例えば血清 h p H A s e または尿 h p H A s e、好ましくは h p H A s e）の低下を伴う L u C a - 1 遺伝子座外のなんらかの遺伝的欠陥をもつ患者を意味する。L u C a - 1 欠陥に付随する症状をもつか、その疑いがある典型的な患者は、正常レベルの h p H A s e を発現しない癌または前癌細胞（例えば転移性癌）をもつ患者である。

これからさらに詳細に本発明について説明する。

ヒアルロニダーゼ活性のアッセイ

本発明の H A s e アッセイは、1-エチル-ジメチルアミノプロピルカルボジアミド (E D C、ClCH₂CH₂Cl、Sigma) およびビオチンヒドラジド (Pierce) を用いる簡単な一工程反応を介して、フリーのカルボキシル基のビオチン付加による H A の標識化を必要とする。簡単に記せば、溶解 H A および溶解ビオチンヒドラジドを含んでなる溶液を E D C と混合する。ビオチンは、E D C および H A に対して過剰に存在するのが好ましい。存在する E D C のモル量は、H A の二糖類単位のカルボキシル基とビオチン部分の N H 基との間に見出されるべき所望の共有結合の数（すなわち H A 二糖類単位数に対する所望のビオチン部分の数）にしたがって変動する。H A 二糖類単位：E D C のモル比は、85：1である一方、ビオチンヒドラジド：E D C のモル比は38：1であるのが好ましい。得られる H A - b H A 化合物の代表的な化学構造を図1に示す。

H A - E D C - ビオチンヒドラジド反応の完了後、非共役ビオチンを透析、好ましくは蒸留水に対して透析して除去することができる。得られたビオチン付加 H A 基質 (b H A) は、H A 分子に共有結合した E D C - ビオチン部分を、H A 分子中に二糖類部分200単位毎に、好ましくは二糖類部分150単位毎に、より好ましくは二糖類部分85~100単位毎に1つの E D C - ビオチン比で有する。E D C - ビオチン：H A のモル比は、1：1（例えば二糖類1単位に対して1つの E D C - ビオチンが結合）~ 5：1（例えば二糖類100単位を含む H A 分子に対して1つの E D C - ビオチンが結合）の範囲であろう。b H A 試薬は好ましくは -20 で使用まで保存できる。

H A s e 活性の検出用アッセイ装置は、例えば共有結合部 N H - C H₃ を有する微量定量ウェル（例えばコバリンク (Covalink) - N H 微量定量プレート、NUNC, ニュージャージ州、Placerville) の表面に b H A を接合させることによって調製する。共有結合のための表面の代表的な化学的および物理的構造を図2に示す。そのような基質の調製方法及び化合物を共有結合により固定するのにそのような基質を用いることは、当技術分野で周知

10

20

30

40

50

である（例えば米国特許第5,427,779号明細書（1996年6月27日発行）およびPCT公開出願第WO8905329号（1989年6月15日公開）を参照のこと）。bHAをアッセイ装置に接合することは、例えば製造元の説明書にしたがってコバリンク-NHウェル中でEDCとともにbHAをインキュベートすることによって達成される。未結合bHAはウェルを緩衝液で洗浄して除去される。プレートのウェルに残留するbHAは該ウェルの表面に共有結合している。得られたアッセイ装置は、テストサンプルに曝されるべき表面に共有結合したbHAを含み、このbHAは、少なくとも1つの共有結合、好ましくはbHA分子中の二糖類単位200毎に少なくとも1つの共有結合、より好ましくは二糖類単位100毎に少なくとも1つの共有結合、最も好ましくはbHA分子中の二糖類単位50毎に少なくとも1つの共有結合によって該表面に結合している。プレートを調製後約1週間から10日以内に使用するの
10

が好ましい。HAse活性アッセイを、共有結合bHAを有するアッセイ装置のウェルにテストサンプルを配置し、テストサンプル中のhpHAseがウェル中のbHAを分解するのに十分な時間、サンプルをインキュベートすることによって行う。テストサンプルは、HAse活性を有すると考えられるいずれのサンプル（例えば生物学的サンプル（例えば血液、血清、血漿、尿、または組換え供給源に由来するサンプル）または生化学的精製中の工程で得られるサンプル）でもよい。既知量のhpHAse活性を有するサンプルをコントロールとして該アッセイを行うのが好ましい。

インキュベーション緩衝液のpHは、サンプル中のHAse活性の最適pHにしたがって調節できる（例えば、中性HAse活性（pH約7.0~7.5）、酸活性HAse活性（pH約4.5より低く、好ましくは約pH3.0~3.7である）。インキュベーション後、ウェルを洗浄して分解bHAを除去し、例えば残留bHAとアビジンペルオキシダーゼとの反応及びマイクロプレート読み取り装置による検出によって残留する未分解bHAを検出する。bHAがアッセイ装置に共有結合することによって、未分解bHAがプレートから流出することを防止し、したがってアッセイの感度および精度が高まる。さらに、本アッセイは完了までにわずか60分またはそれ未満を必要とするだけで、さらに感度は通常の比色アッセイ（Afifyら、上掲書）より1,000倍高く、SDS式ゲルザイモグラフィよりも約1,000~5,000倍高い。本発明のHAseアッセイは、サンプル中の酸活性または中性HAse活性の有無を（定性的または定量的に）決定しようとする種々の用途に用いることができる。ある態様として、本発明のHAse活性アッセイは、HAse活性における欠陥（例えばhpHAseの血漿活性低下を伴うLuCa-1/hpHAseにおける欠陥）を有する患者の同定に有用である。
20

ヒアルロニダーゼの比活性は濁度減少単位（TRU）で表される。1TRUは、ヒアルロニダンの酸性溶液の濁度を減少させるために必要なヒアルロニダーゼ活性の量と定義され、U.S.P./国民医薬品集（NF XIII）単位（NFU）に相当する。上記のアッセイを用いて得られた結果は、U.S.P.によって標準化したヒアルロニダーゼサンプル（例えばWYDASE（登録商標）、Wyeth-Ayerst）の標準曲線を介してTRU、NFUおよびU.S.P.単位と関連させることができる。例えば、標準曲線をウシ精巢ヒアルロニダーゼ（WYDASE（登録商標））の段階的希釈物を同時にインキュベートすることによって作成し、4種のパラメーター曲線で内挿した既知サンプルの活性を適合させて、相対的TRU（rTRU）/mLにおける値を得ることができる（Dorfmanら、J.Biol.Chem., 172:367（1948））。
30

生化学的hpHAse精製方法

酸活性ヒアルロニダーゼ活性は、非イオン性洗剤（例えばトリトンX-114）による温度誘発洗剤相抽出によって顕著に濃縮および/または精製することができる。一般に、例えばhpHAseのような酸活性HAse（aaHAse）を含むサンプルまたは含むと思われるサンプルを、低温（例えば実質的に室温より低い温度、好ましくは約15 未満、より好ましくは約4 ）で非イオン性洗剤を含む溶液に溶解する。サンプルは、例えば未加工ヒト血漿、血小板脱顆粒のない古くなったヒト血漿（例えばクエン酸塩添加による）、ヒト血漿の脂質分画、ヒト血液、ヒト血清、ヒトの尿、または組換えaaHAseを発現する細胞（例えばホ乳類、昆虫、細菌または酵母細胞、好ましくはホ乳類細胞）の条件
40

10

20

30

40

50

づけ培養液もしくは該細胞溶解物とすることができる。好ましくは、該サンプルはヒト血漿またはヒトの尿であり、これらは特に h p H A s e の豊富な供給源である。血漿からの精製は、血漿分画が血清または全血よりも総タンパク量が少ないので、全血または血清から精製するより有利である。

サンプルを溶解した後、溶液の温度を少なくとも室温またはそれより高い温度（好ましくは約25 より高く、より好ましくは約37 ）に上昇させ、それによって洗剤濃厚相および洗剤希薄相を生成させる。a a H A s e は洗剤濃厚相へ分配される。この洗剤濃厚相は、洗剤濃厚相の除去および温度誘発洗剤相抽出の繰り返しによってさらに a a H A s e が濃縮される。この温度誘発洗剤相抽出を3回繰り返すことによって、出発材料の a a H A s e 活性に対して少なくとも約10倍、好ましくは少なくとも約20倍、より好ましくは少なくとも約60倍 a a H A s e が濃縮される。洗剤濃厚相の a a H A s e 活性は、例えば陽イオン交換クロマトグラフィーおよび/またはヒドロキシルアパタイト樹脂によってさらに濃縮および精製できる。

抗天然 a a H A s e 抗体の製造と特定

ある任意の抗原から抗体を製造する方法は知られているが、これまで抗天然 a a H A s e 抗体（例えば抗天然 h p H A s e 抗体）を製造する試みは失敗に終わっている。変性抗 a a H A s e と結合する抗体は製造されたことがあるが、通常の方法および通常の E L I S A アッセイを用いて製造されたこれらの抗体は、天然の（すなわち非変性）a a H A s e とは結合しなかった（Harrisonら、J.Reprod.Fertil.,82:777-85（1988））。本明細書に開示する方法に従うことによって、天然の a a H A s e （例えば天然の h p H A s e ）と結合する抗体が得られた。同様に、当業者は本明細書に概略した方法にしたがって、他の抗天然 h p H A s e 抗体を含む他の抗天然 a a H A s e 抗体を生成することができる。一般に本発明は、天然の a a H A s e と結合する抗体を検出するスクリーニングアッセイを提供することによって、a a H A s e 抗体の製造に付随する問題を克服した。

抗 h p H A s e 抗体の作製

当技術分野で周知であり日常的となっている方法にしたがって、ホ乳類（例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ）の免疫およびハイブリドーマ細胞系の製造に a a H A s e を抗原として用いることができる（例えばHarlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual（1988）, Cold Spring Harbor Laboratory刊、ニューヨーク州、Cold Spring Harbor; 及びSchrierら、Hybridoma Techniques（1980）, Cold Spring Harbor Laboratory刊、ニューヨーク州、Cold Spring Harborを参照のこと）。抗原調製体に用いられる a a H A s e は、該 a a H A s e が天然に存在する供給源（例えばヒト血漿から精製した h p H A s e ）、組換え a a H A s e、生物学的に活性な（例えば抗原的および/または酵素的に活性な）a a H A s e ポリペプチド、天然の a a H A s e、および/または変性 a a H A s e ポリペプチドから精製できる。該 a a H A s e が組換え a a H A s e の場合、該組換え a a H A s e は天然に存在する a a H A s e のアミノ酸配列を有していてもよいが、または天然の a a H A s e に対して（例えばアミノ酸置換、欠失、または付加（例え融合タンパク質）によって）修飾されていてもよい。抗原調製体は、天然の a a H A s e （例えば a a H A s e が天然に存在する供給源から精製された a a H A s e または完全長の組換え a a H A s e ）であるのが好ましい。a a H A s e はいずれの酸活性ヒアルロニダーゼでもよいが、好ましくは a a H A s e は h p H A s e である。

抗 a a H A s e 抗体のためのアッセイ

ハイブリドーマ細胞系によって分泌された抗体は、本発明の抗天然 a a H A s e 抗体アッセイでスクリーニングされる。一般に、このアッセイは、1) 抗抗体; および2) 検出可能に標識化したヒアルロン酸 (H A) が結合した不溶性支持体を必要とする。抗抗体は、抗原の特異性に関係なく a a H A s e 免疫化ホ乳類ホストによって産生された抗体に結合することができる。例えば、免疫化ホストがマウスの場合、抗抗体はヤギの抗マウス抗体（すなわちマウスの抗体で免疫したヤギから得られた抗体）である。抗抗体は、a a H A s e で免疫化したホ乳類ホストによって産生された抗体の F c 部分と結合するのが好ましく、かつ免疫グロブリンのクラスまたはサブクラスに特異的に結合（例えば I g G または

10

20

30

40

50

I g G サブクラス (例えば I g G₁ または I g G₂) と特異的に結合) することができる。抗抗体は、不溶性支持体の表面と共有結合するのが好ましい。検出可能に標識化した H A は、上記の H A s e アッセイにおいてビオチン付加 H A (b H A) であるのが好ましく、上記のように不溶性プレートの表面に共有結合されているのが好ましい。

本発明の抗 a a H A s e アッセイの模式図を図 3 に示す。本発明の抗 a a H A s e 抗体アッセイは、非酸性条件下で (即ち a a H A s e が酵素的に活性でない条件下で)、 a a H A s e はそれらの H A 基質と結合しないという本発明者らの観察を利用する。一般に、本アッセイは、候補抗体を天然の a a H A s e (例えば天然の h p H A s e) を含有するサンプルと接触させて天然 a a H A s e / 抗体複合体を生成させることによって実施される。この接触工程を非酸性、好ましくは中性 p H で行うのが好ましい。続いて、非酸性 (好ましくは中性) 条件下で、結合抗抗体及び検出可能に標識化した H A を有する不溶性支持体とサンプルを接触させ、抗抗体を該候補抗体に結合させることによって天然 a a H A s e / 抗体 / 抗抗体複合体を生成させる。過剰または未結合物質を非酸性 (好ましくは中性) 溶液で洗い流すのが好ましい。

この洗浄緩衝液を、 a a H A s e の酵素活性を許容する p H を有する酸性溶液と置換する。この酸性溶液は、 a a H A s e の H A 分解活性に最適な p H に近い p H であるのが好ましい。例えば、 a a H A s e が h p H A s e である場合、酸性溶液は、 p H 3.7 であるのが好ましい。天然 a a H A s e / 抗体 / 抗抗体複合体中に結合した免疫沈澱させた a a H A s e により、検出可能に標識化した H A が分解されるのに十分な時間、好ましくは 60 分間、サンプルを不溶性支持体と共にインキュベートする。その後、サンプルを洗浄し分解 H A を除去し、未分解 H A をその標識によって検出する。例えば、検出可能標識がビオチンである場合、未分解 b H A は上記の H A s e アッセイで上述したように検出される。 H A の分解はサンプル中の a a H A s e の存在と相関し、該酵素の存在はさらに抗天然 a a H A s e 抗体の存在と相関する。本発明の抗体の一般的性状を以下に説明する。

抗体 / 抗原結合力

抗原と抗体と一緒に保持する力は、4 つの一般的領域に分類される。即ち、(1) 静電気力; (2) 水素結合; (3) 疎水性; 及び (4) ファンデルワールス力である。静電気力は 2 つのタンパク質側鎖上の反対に荷電したイオン群の間の引力による。引力 (F) は電荷間の距離 (d) の二乗に反比例する。水素結合力は、親水基間、例えば - O H、- N H₂ および - C O O H 間の可逆性水素ブリッジの形成による。これらの力は、これらの基を有する 2 つの分子が近接配置されているか否かにもっぱら依存する。疎水力は、水中油滴が合流してただ 1 つの大きな油滴を形成するのと同じ態様で作用する。したがって、非極性疎水基、例えばバリリン、ロイシンおよびフェニルアラニンの側鎖は水性環境中で結合しようとする。最後に、ファンデルワールス力は外部電子雲間の相互作用によって分子間で生じる力である。異なるタイプの力についての更なる知見は当技術分野では既知である (例えば、Essential Immunology (1988、I.M.Roitt 編、第 6 版、Blackwell Scientific Publications 刊) を参照のこと)。

本発明の有用な抗体はこれらの力を全て示す。これらの力を大量に蓄積させることによって、天然の a a H A 酵素に対して高度の親和性または結合力を有する抗体、特に a a H A s e が天然に存在する材料 (例えばヒト血漿) 中で a a H A s e に対して強い結合力を有する抗体を得ることができる。

抗体 / 抗原結合強度の測定

抗体と抗原間の結合親和性は、上述の力の全ての測定値を合計したものである。そのような測定を実施する標準的な手順は当技術分野で既知であり、本発明の抗天然 a a H A s e 抗体の親和性を測定するのに直接利用することができる。

抗体 / 抗原結合親和性を測定する標準的方法の 1 つは、抗原を透過させることができるが抗体を透過させない物質で構成された透析サックを使用する。抗体と完全にまたは部分的に結合する抗原を透析サック内の溶媒 (例えば水) 中に入れる。続いてこのサックを、抗体も抗原も含まないが溶媒のみを含むさらに大きな容器に入れる。抗原のみが透析膜を通過して拡散することができるので、透析サック内の抗原濃度と外側の大きな容器内の抗原

10

20

30

40

50

濃度は平衡に到達しようとする。透析サック内の抗体と結合したままの抗原量と抗体から解離した量を、透析サック内の抗原濃度および透析サック外の溶媒内の抗原濃度を測定することによって算出する。周囲の容器内の溶媒（例えば水）を定期的に更新して一切の拡散抗原を除去することによって、透析サック内の抗原から抗体を完全に解離させることが可能である。周囲の溶媒が更新されない場合、この系は平衡に達し、反応、即ち抗体と抗原間の結合と解離の平衡定数（ K ）を計算できる。平衡定数（ K ）は、透析サック内の抗原に結合した抗体濃度を遊離抗体の結合部位濃度と遊離抗原濃度とを掛けたもので割った値に等しい量である。平衡定数即ち“ K ”値は一般にリットル／モルで測定される。 K 値は、抗原と抗体との複合形で比較したときの遊離状態の抗原と抗体間の遊離エネルギーの差（ ΔG ）の測定値である。 10^7 l / モル ~ 10^9 l / モルまたはそれ以上の親和性または K 値を有する抗天然 a a H A s e 抗体が好ましい。

10

抗体結合活性

上記で指摘したように、“親和性（affinity）”という用語はただ1つの抗原決定基と抗体との結合をいう。“結合活性（avidity）”という用語は抗体と多価抗原との相互作用をいうために用いられる。結合活性に寄与する因子は複雑であり、抗原上の各決定基に対して関連するある血清中の抗体の不均一性および決定基それ自体の不均一性の双方が含まれる。ほとんどの多価抗原では、抗体による2つの抗原分子の結合は個々の抗体の結合の算術的総和よりも常に大きく、通常は何倍も大きい興味深い“ボーナス”効果をもたらす。したがって、抗血清と多価抗原との間で測定される結合活性は、抗体と単一の抗原決定基との間の親和性よりもいくぶん大きいであろうことは理解されるところである。

20

抗天然 a a H A s e 抗体の使用

抗天然 a a H A s e 抗体は、免疫精製技術および免疫検出技術を含む種々の免疫的技術で有用である。そのような免疫的技術で有用な抗天然 a a H A s e 抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

免疫的技術で有用な抗天然 a a H A 抗体は、平衡定数または親和性定数（ K_d ）が少なくとも 10^7 l / モル ~ 10^9 l / モルまたはそれ以上を示すのが好ましい。 10^7 l / モルまたはそれ以上の結合親和性は、（1）ただ1種のモノクローナル抗体（すなわち一種類の抗体が多数存在）、（2）複数の異なるモノクローナル抗体（例えば5種の異なるモノクローナル抗体の各々が多数存在）または（3）多数のポリクローナル抗体によるであろう。（1）～（3）の組み合わせを使用することもまた可能である。

30

好ましい抗体は、サンプル中の天然の a a H A s e の50%以上と結合する。しかしながら、これは上記の（1）～（3）によって示されたとおり幾つかの異なる抗体を用いることによって達成できる。サンプル中のより多くの割合の抗原と結合させる場合、異なる抗体の数を増加させる方がただ1種の抗体よりも一般により効果的である。したがって、天然の a a H A s e と結合する2種以上の抗体を一緒に組み合わせることによって、即ち天然の a a H A s e に対して結合親和性 K_d が 10^7 l / モル以上である2種以上の抗体を一緒に組み合わせることによって、相乗効果を得ることができる。

抗天然 a a H A s e 抗体を用いた免疫精製

抗天然 a a H A s e は、例えば a a H A s e が天然に存在する供給源（例えばヒト血液、血漿、血清または尿由来 h p H A s e）、または組換え a a H A s e の供給源（例えば h p H A s e を発現する形質転換細胞の上清または細胞溶解物）から a a H A s e を免疫精製する場合に用いることができる。本発明の抗天然 a a H A s e 抗体を用いる有用な免疫精製技術には、免疫沈澱、ビーズ上での免疫親和性単離、免疫親和性カラムクロマトグラフィー、および当技術分野で周知の他の方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。抗天然 a a H A s e 抗体は免疫精製技術で有用である。本発明の抗体を用いる免疫精製法では、ただ1種の抗天然 a a H A s e 抗体（例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体）または多数の抗天然 a a H A s e 抗体を用いることができる。

40

さらに、本発明の抗天然 a a H A s e 抗体を用いて、天然の a a H A s e、好ましくは天然の h p H A s e の免疫精製のための装置を調製することができる。一般に、そのような

50

装置は、抗天然 a a H A s e 抗体を不溶性支持体（例えばビーズ、親和性カラム成分（例えば樹脂）または免疫親和性精製で用いられる他の不溶性支持体）に共有結合させることによって調製される。または、磁化カラムを用いることによって抗天然 a a H A s e - a a H A s e 複合体を溶液から分離させることができる金属粒子に該抗体を結合させてもよい。該抗 a a H A s e 抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。不溶性支持体に結合させた抗体（また別には精製で用いられる）はまた、サンプル中の天然の a a H A s e の少なくとも50%と結合することができる装置を提供するために抗 a a H A s e 抗体の混合物を含んでいてもよい。そのような免疫精製装置を用いて、a a H A s e が天然に存在する供給源（例えば未加工血清、未加工血漿または尿由来 h p H A s e）から、または組換えによって製造された a a H A s e から a a H A s e を単離することができる。

10

抗天然 a a H A s e 抗体を用いる定性的および定量的免疫検出

抗天然 a a H A s e 抗体を、免疫検出アッセイを用いて、サンプル中の a a H A s e を検出（所望の場合には定量）することができる。抗天然 a a H A s e 抗体を用いる免疫検出アッセイは種々の態様でデザインすることが可能である。例えば、抗天然 a a H A s e 抗体を用い、不溶性支持体（例えば免疫アッセイカラム、ビーズ、または微量定量プレートのウェル）に結合させた抗天然 a a H A s e 抗体を有するアッセイ装置を製造することができる。抗体を不溶性支持体に共有結合または非共有結合によって付着させる方法は当技術分野で周知である。続いて、a a H A s e を含むと思われるサンプルをアッセイ装置と接触させ、抗天然 a a H A s e 抗体 - a a H A s e 複合体を形成させる。その後、上記の抗天然 a a H A s e アッセイで述べたように、該複合体に結合した a a H A s e 活性によって、または該複合体を検出可能に標識化した第二の抗天然 a a H A s e 抗体と接触させることによって、抗天然 a a H A s e - a a H A s e 複合体を検出することができる。

20

“検出可能に標識化した抗体”、“検出可能に標識化した抗 a a H A s e”または“検出可能に標識化した抗 a a H A s e フラグメント”とは、検出可能標識を結合させた抗体（または抗原結合特異性を保持している抗体フラグメント）を意味する。検出可能標識を通常、化学的接合によって結合する。標識がポリペプチドの場合、標識を遺伝子工学技術によって結合する。検出可能標識は当技術分野で既知の多様な標識から選択できるが、通常は、放射性同位元素、蛍光発光団、常磁性標識、酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ）もしくは検出シグナル（例えば放射能活性、蛍光、発色）を放出するか、又は該標識をその基質に暴露した後検出可能なシグナルを放出する他の分子部分または化合物である。種々の検出可能な標識/基質の対（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ/ジアミノベンジジン、アビジン/ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン）、抗体を標識する方法、および標識化抗体を使用する方法は当技術分野で周知である（例えば、Harlow & Lane編、Antibodies:A Laboratory Manual（1988,Cold Spring Harbor Laboratory刊、ニューヨーク州、Cold Spring Harbor）を参照のこと）。

30

または、検出可能に標識化した抗天然 a a H A s e 抗体を直接用いて、サンプル中の a a H A s e を検出および/または定量することができる。例えば、検出可能に標識化した抗天然 a a H A s e 抗体を L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥を有すると思われる組織サンプル（乳房、卵巣又は肺由来の組織サンプル）と十分な時間接触させて、抗天然 h p H A s e と組織サンプル中の h p H A s e（例えば組織サンプル中の細胞形質膜内の h p H A s e）との複合体を形成させることができる。続いて、該抗天然 h p H A s e 抗体と結合した検出可能標識によって、抗天然 h p H A s e 抗体の結合を検出および/または定量することができる。または、抗天然 h p H A s e 抗体の結合、抗天然 h p H A s e 抗体と結合する抗体を用いて検出してもよい。続いて、抗天然 h p H A s e 抗体の組織サンプルとの結合を、コントロールサンプル（例えば、L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥をもたない正常サンプルおよび/または L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥に関連する組織を含むサンプル）との抗天然 h p H A s e 抗体の結合、および患者の L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥の有無と相関する抗体結合と比較することができる。

40

本明細書で提供される開示を読み進むにしたがって当業者には明らかなように、a a H A

50

s eの免疫検出アッセイは種々のサンプルを用いて種々の異なる態様で用いることができる。例えば、a a H A s eの免疫検出アッセイを用いて、h p H A s e治療を受けている患者の血清または血漿サンプル中のh p H A s eを検出し、および/または患者の腫瘍進行、治療への応答および/または患者の身体へのh p H A s eの取り込みに関して患者の血清または血漿中のh p H A s eを相関させることができる。

h p H A s eが血清または尿中で検出される場合、h p H A s eレベルは、L u C a - 1欠陥に関連する症状に対する感受性および/または該症状の存在および/または該疾患の重篤度と相関させることができる。例えば、L u C a - 1においてヘテロ接合型欠陥に関連する肺癌をもつ患者のh p H A s eレベルは正常なh p H A s eレベルの50%に近い。一方、L u C a - 1におけるホモ接合型欠陥をもつ患者は、非常に低いかまたは検出不能のh p H A s eレベルを示す。したがって、本発明のa a H A s eアッセイで検出されるように、または本発明の抗天然h p H A s e抗体を用いて検出されるように、h p H A s eレベルは腫瘍の進行と相関させることができるだけでなく、L u C a - 1における遺伝的欠陥と直接的に相関させることが可能であり、したがってL u C a - 1欠陥に関連する症状(例えば癌)の疑いのある患者の特定が可能である。したがって、本発明は、h p H A s eレベルを患者の機能的対立遺伝子の数と直接相関させ、さらに血液、血漿、血清または尿中のh p H A s eレベルを単純に確認することによって遺伝的欠陥の検出を可能にする。

10

h p H A s eの製造方法

上記に概略した精製手順の他に、h p H A s eヒアルロニダーゼポリペプチドは、標準的合成技術、または組換えDNA技術を用い、さらに細菌、酵母もしくはホ乳類細胞で標準的技術により発現させることによって、製造できる。本明細書で用いるとき、“h p H A s e”という用語は、該用語が用いられている内容が明瞭に別の意味を指している場合を除いて、該タンパク質の天然型、組換え型および修飾形を含む。

20

化学合成

h p H A s eは、本明細書に記載したアミノ酸配列およびその変種配列を基にして、Clark-Lewisら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:3574-3577(1993);及びClark-Lewisら、Biochemistry,30:3128-3135(1991)に記載されたtert-ブチルオキシ-カルボニル及びベンジル保護法を用いる標準的固相法によって合成できる。フッ化水素による脱保護の後で、該タンパク質は空気酸化によって折り畳まれ、逆相HPLCによって精製される。純度は、逆相HPLCおよび等電点フォーカシングによって決定される。アミノ酸の取り込みは合成の間モニターされ、最終組成はアミノ酸分析によって決定される。タンパク質の正確な共有結合構造はイオンスプレー質量分析法(SCIEX APIII)を用いて確認できる。

30

h p H A s eポリペプチドの合成のための組換えDNA技術

下記実施例で考察するように、L u C a - 1(配列番号:3)およびh p H A s e(配列番号:1)は同一である。h p H A s eのアミノ酸配列(配列番号:1)とL u C a - 1のアミノ酸配列(配列番号:3)との間の唯一の変化は、27番目のアミノ酸残基のN末端におけるL e uがV a lに置換されていることである(この場合シグナル配列のN末端のM e tが最初のアミノ酸残基として数えられている)。しかしながらこの2つのタンパク質はそれ以外ではアミノ酸配列並びに免疫学的および生化学的性状は同一である。h p H A s eをコードするヌクレオチド配列はL u C a - 1をコードする配列(配列番号:4)と同一であるが、ただし、27番目のアミノ酸残基(L u C a - 1でL e u、h p H A s eでV a l)に対応するコドンの第三の残基のシトシンがグアニンに置換されている点を除く。したがって、L u C a - 1をコードするヌクレオチド配列(配列番号:4)はh p H A s eをコードするヌクレオチド配列である。L u C a - 1/h p H A s e遺伝子は単離され、配列が決定されている(Baderら、GenBank受託番号U03056,NIDG532973,1993年11月1日提出;GenBank受託番号U96078も参照されたい)。Baderらが報告したL u C a - 1のアミノ酸およびヌクレオチド配列を下記に示す。

40

MAGHLLPICALFLTLLDMAQGRGPLVNRPFVWNANTQWCLERHGVVDVSVFDV
 VANPGQTRFRGPDMTIFYSSQLGTYPPYPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAP
 DFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGA
 ARAWMAGTLQLGGALRPRGLWGFYGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGLWLW
 GQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDFTN
 HFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGA
 LLCSQALCSGHGRCVRRRTSHPKALLLNPAFSIQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEF
 KCRCYPGWQAPWCERKSMW (配列番号 : 3)

1 ttctccagg agtictggt gcagctggg tggaaatcgg ccaggccctg ctaggcccc
 61 catctgggg tcaggaatt tggaggataa ggccttcag cccaaggic agcaggggac 10
 121 agcgggcaga ctggcgggtg tacaggaggg ctgggtgac ctgctctgg tcaactgaggc
 181 catggatct tctccagtg gctgccagga ttctgggtg aagagacagg aaggcctccc
 241 ccccttggtc gggtcagcct gggggctgag ggctggctg tcagccatic tcccagaac
 301 atatgtcatg gcctcagtg ctcaggggga agcaggggtg ggcgagctta ggctagagca
 361 agtctgtgg gagatggcag aggcctggtc tgagaggcaa ctgggatg cctccagtg
 421 gccatgctc cctccatcg tctcccctg cctctggag cctgcaggt caatgttaa
 481 cagaaccag agcagcggg gattaatcg caagggtca gccccagc cctgagcagt
 541 gggggaatc gagacttgc aacctgtct cagctctcc tcccctggc aggtgtcct
 601 cgaccagtc cgtgccatg caggccact gctcccac tcgcctctc tctgacct
 661 actgatatg gcccaaggct ttggggccc ctggtaacc aaccggcct taccaccgt
 721 ctggaatga aacaccagt ggtgctgga gaggcaggt gtggcagtg aigtcaggt
 781 ctctgatg tgagcaacc cagggcagac ctccgaggc cctgacatga caatttcta 20
 841 tagtcccag ctggcact accccta cagccact ggggagcctg ttttgggtg
 901 tctgcccag aatgccagc tgattgcca cctggcccgc acatccagg acatcctggc
 961 tgccatact gctctgact tctagggt ggcagtcac gactgggagg catggcggcc
 1021 acgctgggccc tcaactggg acaccaagga cattaccgg cagcctcac gggcactggt
 1081 acaggcacag caccctgat ggccagctc tcagggtgag gcagtagccc aggaccagt
 1141 ccagggagct gcacgggct ggaatggcagg caccctcag ctgggggggg cactgctcc
 1201 tcgcggtc tggggtct atggctccc tgactgctc aactatgact tctaagccc
 1261 caactacac gccagtgcc catcagcct cctgcccac aatgaccagc taggtggtc
 1321 gtggggccag agcctgccc tctatcccag catctatg cccgagctg tggaggcac
 1381 agggaagta cagatgatg tgcaacacc tgggcccag gattccgtg tggctgtggc
 1441 tctgggtgac ccaatctg cgtgctgccc ctatgccc atctctatg acacgacaaa
 1501 ccacttctg cccctggat agctggagca cagcctggg gagagtgcg cccagggggc 30
 1561 agctggatg gtgcttggg tgagctgga aatacaaga accaaggaat catgtaggc
 1621 catcaaggag tatatggaca ctactggg gccttcac ctgaactga ccagtggggc
 1681 ccttctctg agtaagccc tgtgctcgg ccatggccc tgtgcccgc gcaccagcca
 1741 ccccaagcc ctctctcc ttaacctgc cagtctcc atccagctc gcctgggtg
 1801 tggccccctg agcctcggg gtgcccctc actgaagat caggcacaga tggctgga
 1861 gttcaaatg cgatgctacc ctggctgga ggcaccgtg tggagcga agagcatg
 1921 gtgattggc acacactgag ttgcacat tgagaacct atgactctg ggtctgcca
 1981 gggcttctc aatacatg acagctac aagctatgt cacagtaag agtacactc
 2041 gccactgca caggcatat cctgcacac acatgcatac ttacagactg gaatagtggc
 2101 ataaggagt agaaccacag cagacacat tcaatctgc tccatgca tctactggc
 2161 aaggctatg acaatctc cagagact gagccagct tgaactga gcaatcaaa
 2221 aggtgacat tcaatgag cctactctt gccaatccc gtgtaagc tttatgtg 40
 2281 acttactc tctcacaat gaggctatg gaaactgag tcaactcat tgagagtaag
 2341 caggtgccc aaggtgac agcaagaaa gggagaagt gagattcaa cccaggtgt
 2401 ctgctcgg ggtacagcc ctgactcc tactgagtt gtgtaacca gccctgacg
 2461 acccctgat ctgctgag gcaccagtc agcaataaa gcagctatg ttactt (配列番号 : 4)

h p H A s e をコードするヌクレオチド配列は、当技術分野で周知の種々の方法のいずれによっても単離できる。例えば、h p H A s e をコードするDNAは、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーからハイブリダイゼーションによる方法で単離できる。または、例えばムリスら (Mullisら、米国特許第4800159号明細書) が記載したように、合成オリゴヌクレオチドプライマーの標準的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、または当技術分野で周知の発現クローニング法 (例えば Sambrookら、Molecular Cloning: A La 50

boratory Manual、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press刊、ニューヨーク州、Cold Spring Harbor)を参照のこと)を用いて単離することができる。h p H A s eをコードするDNAを特定するためにハイブリダイゼーションまたはPCRが用いられる場合は、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの配列は、上記に提示したL u C a - 1のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を基にすることができる。h p H A s eポリペプチドをコードする単離DNAの配列は当技術分野で周知の方法を用いて決定できる(例えばSambrookら、上掲書を参照のこと)。配列を確認した後で、得られたクローンを用いて、例えばh p H A s eの類似体(例えば、h p H A s eをコードする他のヒト対立遺伝子またはホ乳類の別の種(例えばイヌ、ラット、マウス、霊長類、ウシ)の酸性血清ヒアルロニダーゼ)を同定するか、および/またはh p H A s eをコードするDNAを発現させる目的で(例えば宿主細胞、好ましくは患者の癌性細胞でのh p H A s eポリペプチド発現による抗癌療法の場合のように)宿主の標的細胞を形質転換させることができる。

10

h p H A s eをコードする構築物の作製とh p H A s eポリペプチドの発現

h p H A s eをコードする構築物の作製およびh p H A s e発現のために多数のベクターが利用できる(例えば、American Type Culture Collection,メリーランド州、ロックビルを参照のこと)。好ましくは、ベクターは真核細胞性宿主でも原核細胞性宿主でも増殖が可能であり、一般に細菌由来の複製点と問題のDNAに機能可能に連結された真核細胞性プロモーターを含んでなり、それによってh p H A s eをコードする構築物の製造が可能となる。適切な宿主細胞、並びに安定的に形質転換された宿主細胞系を構築する方法は、公共に供されている。例えば、Pouwelsら、(1985) Cloning Vectors: A Laboratory Manual; Ausubelら、(1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons刊、ニューヨーク; Sambrookら、上掲書; Kormalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2150-2154 (1987)を参照のこと。これらの文献の各々は、問題のDNAを操作するための方法および組成物についての参考のため本明細書に含まれる。

20

構築物中のプロモーターが当該h p H A s eコード配列と機能的に連結されるように、h p H A s eポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を核酸ベクターに挿入することによって、h p H A s eポリペプチドの発現を達成する。その後、その構築物は、宿主細胞を形質転換するために用いられる。h p H A s e発現は、一時的発現、構成型発現または誘発型発現のいずれかによってホ乳類細胞系で達成することができる。好ましい態様の1つとして、宿主細胞はホ乳類細胞、好ましくはc o s - 7細胞系またはc o s - 7細胞由来細胞系である。より好ましくは、h p H A s e製造用宿主細胞は、h p H A s e発現に対して防御されているホ乳類細胞である(即ち、該宿主細胞に悪影響(例えば細胞成長遅延、細胞死)を与えることなく該細胞が高レベルでh p H A s eを産生できる)。ある態様として、h p H A s e耐性細胞はSV-形質転換細胞系またはアデノウイルス形質転換細胞系(すなわち切断アデノウイルスで形質転換した細胞系)、好ましくはHEK細胞系(HEK293)である。例えば、強力なプロモーター(例えばCMV)で起動されるh p H A s eをコードするDNAによるHEK細胞の形質転換によって、驚くほど高いh p H A s e発現および培養液中への分泌がもたらされる(約 2.9×10^{-10} mg/細胞/24時間)(> 100 r T R U)。そのような細胞系を使用することにより、例えばタンパク質治療で使用することができる十分量のh p H A s eを製造することができる。

30

40

h p H A s eに耐性をもたない腫瘍細胞系での発現が望まれる場合、h p H A s eをコードするDNAは、好ましくは誘発性プロモーター、好ましくは形質転換されたh p H A s e構築物含有細胞の近辺の他のホ乳類細胞には顕著な影響を与えない誘発剤に応答性を有する誘発性プロモーターの制御下に置かれる。例えば、h p H A s eをコードするDNAは、ステロイド誘発性プロモーター下に置くことができる(例えば、エクジソン発現系ではムリステロン(muristeron)によって誘発することができる)。標的細胞は形質転換され、誘発剤に暴露されたときにh p H A s eを発現する。

腫瘍をもつ患者の処置を目的として腫瘍細胞を形質転換するためにh p H A s eコードDNAが使用される場合、該h p H A s eをコードするDNAは一過性、構成的または誘発

50

的に発現できるが、好ましくは一過性または構成的に発現され、より好ましくは構成的に発現される。これに加えて、またはこれとは別に、腫瘍周囲の細胞（例えば腫瘍細胞の近傍の細胞）またはh p H A s eを発現し分泌することができる他の細胞（例えば肝細胞または単球）を形質転換させてもよい。

組換えh p H A s eポリペプチドの発現（例えば本明細書で開示する発現系のいずれかによる産生）は、免疫学的手順、例えば組換え細胞抽出物のウェスタンブロットまたは免疫沈澱分析によって、または本明細書で開示する本発明のH A s e活性アッセイによってアッセイすることができる。例えば、本発明のh p H A s eポリペプチドは、適切な発現担体中のh p H A s eポリペプチドをコードするヌクレオチド配列によって適切な宿主細胞を形質転換し、さらに該コードポリペプチドの発現を促進し、さらに好ましくは培養液中へのh p H A s eの分泌を促進する条件下で該形質転換細胞を培養することによって産生できる。形質転換の方法および発現担体の選択は選択した宿主システムに左右される。分子生物学分野の通常の技術を有する者にとって、種々の原核細胞および真核細胞発現系を用いて本発明のh p H A s eポリペプチドを産生することができることは理解されよう。

生物学的に活性なh p H A s eポリペプチドの同定

h p H A s eポリペプチドをコードするDNAは、h p H A s eの全部または一部をコードすることができる。h p H A s eポリペプチドは生物学的に活性であるのが好ましく、例えばヒアルロنانの切断で酸活性ヒアルロニダーゼ活性を示し、および/または抗天然h p H A s e抗体により結合することができる。一般に、あるタンパク質の抗体を誘発する能力に関する知見および/または問題のタンパク質の酵素的または他の生物学的活性に関する知見がいったん得られれば、完全長のタンパク質の生物学的に活性なポリペプチドを同定する方法は、特に本発明の場合のように問題のタンパク質（ここではh p H A s e）をコードするヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列が提供されている場合、当業者には日常的なことである。

生物学的に活性なh p H A s eポリペプチドは、本発明のH A s eアッセイを用いることによって、または通常のH A s eアッセイ（例えばE L I S A様ヒアルロナンアッセイ（Sternら、Matrix,12:391-403（1992））もしくは基質ゲルザイモグラフィ（Guentenhoe nerら、Matrix,12:388-396（1992）））を用いることによって同定できる。または、生物学的に活性なh p H A s eポリペプチドは、形質転換宿主細胞の上清および/または細胞溶解物の成分に抗天然h p H A s e抗体を結合させることによって検出できる。h p H A s eポリペプチドは、好ましくは天然のh p H A s e活性の少なくとも25%、より好ましくは50%、さらに好ましくは75%、一層好ましくは95%を示す。

h p H A s eと同種のヒアルロニダーゼの同定

h p H A s eと同種のヒアルロニダーゼをコードするDNA（例えば、天然h p H A s eに対して保存的アミノ酸置換を含む）は、h p H A s eのDNA配列および/またはアミノ酸配列（例えば、L u C a - 1 / h p H A s e配列）を基にしたオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションまたはPCRによって、種々のcDNAライブラリーまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。または、使用するオリゴヌクレオチドは、例えば選択したh p H A s eのアミノ酸配列を基にして縮退させるか、または保存的アミノ酸置換を有するh p H A s e様アミノ酸配列をコードするDNAの検出または増幅を可能にするためおよび/またはスクリーニングされるべきホ乳類種のDNAにおけるコドン使用頻度を考慮するためにデザインしてもよい。そのような“縮退オリゴヌクレオチドプローブ”は、ハイブリダイゼーションスクリーニングの感度を高めるため、かつ他の種のh p H A s e類似体またはh p H A s eをコードするヒトの対立遺伝子変種を同定し単離するために組み合わせ用いることができる。アミノ酸および/またはヌクレオチド配列がコードするタンパク質を特定するために縮退オリゴヌクレオチドプローブをデザインし使用する方法、並びに同種DNAのスクリーニングおよび単離のためのハイブリダイゼーション方法およびPCR技術は、当技術分野では日常的であり周知である（例えば上掲書（Sambrookら）を参照されたい）。

10

20

30

40

50

または、h p H A s e をコードするD N A は、当技術分野で周知の発現クローニング法によって単離できる（例えば上掲書（Sambrookら）を参照のこと）。例えば、ホ乳類細胞をc D N A 発現ライブラリー、即ち、真核細胞プロモーターに機能可能に連結された種々のc D N A フラグメントを含むクローン集合体で形質転換できる。h p H A s e 類似体またはその生物学的に活性なフラグメントの発現は、本発明のH A s e 活性アッセイを用いて培養上清および/または細胞溶解物を分析して検出できる。

h p H A s e ポリペプチドを用いる治療法

本発明の実質的に純粋な天然のh p H A s e ポリペプチド（例えばh p H A s e が精製された血漿の成分を伴わないh p H A s e ポリペプチド）は、ヒトおよび動物の治療を含む多様な用途において、単独または他の治療薬とともに用いることができる。処置すべき症状が過剰なヒアルロン酸と関連を有する場合、および/または治療が一般にH A s e 活性を高めるためにデザインされている場合、本発明の精製h p H A s e は一般に、中性H A s e 製剤即ちWYDASE™（商標）の代わりに用いることができる（すなわち、従来の中性ヒアルロニダーゼ含有製剤は、中性H A s e 活性における特定の欠陥を処置するためには用いられず、むしろH A s e（中性または酸活性）活性を提供する）。酸活性h p H A s e はH A 基質の制御された分解を提供し、患者の細胞外マトリックスの全成分を分解するわけではないので、酸活性h p H A s e を使用する方が中性H A s e を使用するより好ましい。

h p H A s e を過剰なヒアルロンに付随する疾患の処置に用いて、投与部位での生理学的液体の循環を高めることができる（例えば分散剤として、例えば皮下または局所施用（例えば化粧用クリームのような化粧品製剤の場合）によって、および/または単独または化学療法剤と併用する抗癌剤として）。例えば、h p H A s e を患者に投与し、注入、特に皮下注入を促進することができる。h p H A s e はまた、卒中または心筋梗塞を発症した患者に（例えば輸液によって）投与できる。好ましくは、h p H A s e は、ヘパリン、強力なヒアルロニダーゼ抑制物質、の非存在下または極めて低レベル下で投与される。心筋梗塞の治療のための投与方法および投与されるh p H A s e 量は、ウシの精巢ヒアルロニダーゼの投与方法および投与量を基準にすることができる（例えばWolfら、J.Pharmacol. Exper. Therap., 222:331-7（1982）; Braunwaldら、Am. J. Cardiol., 37:550-6（1976）; DeGiovanniら、Br. Heart J., 45:350（1961）; DeOliveiraら、Am. Heart J., 57:712-22（1959）; Klonerら、Circulation, 58:220-6（1978）; Klonerら、Am. J. Cardiol., 40:43-9（1977）; Kovenら、J. Trauma, 15:992-8（1975）; Macleanら、J. Clin. Invest., 61:541-51（1978）; Macleanら、Science, 194:199-200（1976）; Marokoら、Ann. Intern. Med., 82:516-20（1975）; Marokoら、N. Engl. J. Med., 296:896-903（1977）; Marokoら、Circulation, 46:430-7（1972）; Salet, Clin. Biochem., 13:92-94（1980）; Snellら、J. Clin. Invest., 50:2614-25（1971）; Wolfら、Circ. Res., 48:88-95（1981）を参照のこと）。

さらに、h p H A s e はまた、ヒアルロニダーゼにおける欠陥に付随するある種のリソソーム貯蔵疾患をもつ患者に投与するとき治療効果を示すことができる（Natowiczら、N. Engl. J. Med., 335:1029-33（1996））。h p H A s e は、シャント経路の形態としてヒアルロニダーゼの直接投与（例えば細胞内または静脈内）によって、及び/または遺伝子治療（例えば、L u c a - 1 遺伝子の欠陥複製物を置換する）によって治療的に用いることができる。h p H A s e 治療法が効果を発揮するリソソーム貯蔵性疾患は、不完全なマンノース-6-ホスフェート経路による[GlcNAc 1-4GlcUA 1-3]_n（GAGs）の蓄積をもたらす疾患である。H A s e 活性はマンノース-6-ホスフェート経路に依存しないので、h p H A s e はこれらの蓄積G A G l s を非機能的細胞系の下で分解することができる（Herdら、Proc. Soc. Experim. Biol. Med., 151:642-9（1976））。

h p H A s e はまた、脳腫瘍に付随する浮腫、特にグリア芽細胞腫の多形性型に付随するものの処置に用いることができる。脳腫瘍に付随する浮腫は、腫瘍近辺の脳の非癌性部分のヒアルロニダーゼの蓄積によって生じる。ヒアルロニダーゼ蓄積部位にヒアルロニダーゼを（例えば静脈内注射またはシャント形成による）投与することにより、これらの部位で過剰なヒアルロニダーゼを分解することによってそのような悪性疾患に付随する浮腫を軽減する。し

10

20

30

40

50

たがって、ヒアルロニダーゼは、腫瘍塊の減少および腫瘍成長および/または転移の抑制において、脳腫瘍の処置で有効であるだけでなく、悪性疾患に付随する浮腫の軽減に有用である。h p H A s e は、浮腫の処置のためのウシ精巢ヒアルロニダーゼを投与する場合と同様な態様で浮腫を処置する目的として投与できる (SaEarp, Arq. Braz. Med., 44: 217-20 を参照のこと)。

特に興味深いことは、非癌性 (正常) 細胞と比較して検出不可能 h p H A s e 活性が低下した転位性および非転位性癌、特に転位性癌の処置において h p H A s e ポリペプチドの使用である。h p H A s e は、種々の癌、特に侵襲性腫瘍の一切の処置において、化学療法剤として (単独または他の化学療法剤と一緒に) 用いることができる。例えば、h p H A s e ポリペプチドは、小型肺細胞癌及び有棘肺細胞癌、並びに乳房、卵巣、頭部および頸部の癌に用いることができるか、又は h p H A s e のレベル低下もしくは不完全 L u C a - 1 (h p H A s e) 遺伝子 (例えば、適切なレベルの h p H A s e の発現を提供しないか、または適切なレベルのヒアルロニダーゼ活性を提供できない不完全な h p H A s e をコードする L u C a - 1 遺伝子) または h p H A s e 活性の減少を伴う他の欠陥に関連する他の一切の癌の処置に用いることができる。

h p H A s e はまた、通常の化学療法に耐性を示す腫瘍の感受性を高めるために使用することができる。ある態様として、h p H A s e は、L u C a - 1 欠陥に関連する腫瘍をもつ患者に、腫瘍部位周辺の拡散を高めるため (例えば、化学療法剤の循環を高めるため (例えば腫瘍部位または腫瘍部位周辺の化学療法剤の循環および/または濃度を高めるため)、腫瘍細胞の運動性を抑制するため (例えば H A 分解によって) および/または腫瘍細胞のアポトシスの閾値を下げるため (即ち腫瘍細胞をアノイキスの状態に置くため、すなわち、細胞死を促進することができる、好ましくはアノイキス状態の細胞のプログラム化された細胞死をもつばら促進することができる化学療法剤または他の薬剤の作用に対して腫瘍細胞の感受性を高める状態に置くため) ために有効な量で投与される。本明細書で用いられるとき、化学療法剤は、腫瘍細胞成長の抑制を促進する、より好ましくはもつばら腫瘍細胞死を促進する全ての分子、合成 (例えばシスプラチン) 並びに天然に存在する (例えば腫瘍壊死因子 (T N F)) 分子を包含する。

h p H A s e による処置が有効な疾患もしくは症状を有するかまたはそれらに感受性を有する患者は、種々の通常の方法または本発明のアッセイ装置を用いて特定できる。本発明の装置は、血液、血漿、血清または尿 h p H A s e レベル、好ましくは血液、血漿または血清レベルを決定し、該レベルを L u C a - 1 欠陥と関連させるために上記で述べたように抗天然 h p H A s e 抗体が結合されている。例えば、患者が h p H A s e 活性の低下に付随する症状を有すると疑われるか、またはそのような状態に感受性を有すると疑われる場合、生物学的サンプル (例えば血液、血清または血漿) を患者から得て、上記のように抗天然 h p H A s e 抗体を用いて H A s e アッセイおよび/または免疫アッセイによって分析することができる。

または、患者が L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥に関連する癌を有するかまたはその疑いがある場合に特に、抗天然 h p H A s e 抗体を用いて、組織サンプル中の h p H A s e レベル (例えば、腫瘍組織に付随する細胞の形質膜、これら細胞内又はその周囲細胞に存在する h p H A s e) を決定することができる。正常 (すなわち非癌性) 組織サンプルに付随する h p H A s e レベルと比較して組織サンプル中の h p H A s e レベルが低下していれば、L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥に関連する癌が示唆される。

h p H A s e の投与ルートおよび投与される量は、処置すべき疾患、並びに大きさ、体重、年齢、疾患の重篤度および治療への応答性を含む患者の種々の変動因子にしたがって大きく変動するであろう。適切な投与ルートおよび用量を決定する方法は、一般に担当医によってケースバイケースで決定される。そのような決定は当技術分野で通常の技術を有する者には日常的である (例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine (第11版、1987) を参照のこと)。例えば、h p H A s e を用いて皮下注入を促進させる場合、h p H A s e を含む溶液を皮下注射によって投与し、該溶液 (例えば栄養剤、体液補充液または血圧上昇溶液) の吸収を促進する。h p H A s e は、注射、例えば皮下、筋肉内、

10

20

30

40

50

眼窩内、囊内、腫瘍周辺内および静脈内注射を含む非経口注射によって投与されるのが好ましい。

好ましい態様として、例えば、h p H A s e を腫瘍周辺に注射するか、腫瘍塊に直接 h p H A s e を注射するか、及び / 又は h p H A s e を発現し分泌することができる腫瘍細胞、腫瘍周囲細胞もしくは他の細胞（例えば肝細胞または単球）に h p H A s e コード D N A を導入することによって、直接 h p H A s e ポリペプチドを腫瘍部位に送達することにより、h p H A s e で処置可能な腫瘍をもつ患者に h p H A s e ポリペプチドを投与する。h p H A s e は脂肪酸（例えば脂質部分）が修飾されているので、h p H A s e の作用が必要とされている部位に注射された後、h p H A s e は容易に細胞の形質膜に取り込まれる（例えば、J.Cell Bio.,131(3):669-77(1995)を参照のこと）。さらに、h p H A s e はまた、L D L（低密度リポタンパク質）レセプターと複合体を形成し、レセプター仲介エンドサイトーシスによって細胞内に内在化される。

ある好ましい態様として、h p H A s e はリポソーム製剤で患者に投与され、標的細胞（例えば L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥をもつ癌細胞）への h p H A s e の細胞内薬剤送達および / またはそのような標的細胞の形質膜への h p H A s e 取り込みをもたらす。リポソーム製剤は、リポソーム内に取り込まれた h p H A s e の特異的な標的指向性薬剤送達を標的細胞に提供するために調製されるのが好ましい。h p H A s e は水溶液にかなり不溶性であるので（例えば、N a C l 濃度が 50 m M 未満のとき h p H A s e は水溶液で沈澱する）、リポソームへの取り込みは、h p H A s e の脂肪酸鎖の翻訳後修飾に付随する h p H A s e の生化学的性状のために一層可溶性の調製物を作成する。さらに、h p H A s e を循環系に導入することによって、h p H A s e は血漿のこれらの脂質分画と同時に精製されるので、h p H A s e と高密度リポタンパク質（H D L）複合体との結合をもたらすおそれがある。

本発明者らによって同定された生化学的性状は、h p H A s e がリポソームに容易に取り込まれることができることを示唆している。リポソームの調製方法およびそれを投与する方法は当技術分野では周知である。例えば、h p H A s e 含有リポソームは、Liposome Technology, G.Gregoriadis 編、(1984) CRC Press 刊、フロリダ州、Boca Raton に記載されるように、洗剤を含まない免疫親和性精製（I A P）h p H A s e とリポソーム製剤とを混合することによって調製できる。本発明のリポソーム製剤は、h p H A s e 活性を増大させる化合物を含有するのが好ましい。好ましい態様として、h p H A s e リポソーム製剤は、コレステロールおよび / またはカルジオリピン、より好ましくはカルジオリピンを含有する。理論に支えられていないが、カルジオリピンは、h p H A s e の変性を防ぎ、したがって酵素の安定性を維持しかつ標的細胞の形質膜へのその取り込みを増大させることによって h p H A s e の活性を高める。本発明者らが発見したように、h p H A s e 活性は、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンの存在下では増大されない。コレステロールおよびカルジオリピンを含有するリポソーム製剤が特に好ましい。h p H A s e が治療、例えば化学療法に用いられる場合は特に、1 つまたは 2 つ以上の所望の性状を提供する目的で h p H A s e を修飾するのが望ましい。例えば、h p H A s e は血清タンパク質であり、したがって血清中では十分な半減期を本質的に備えているが、例えばポリペプチドを修飾してその生物学的半減期（例えば血清半減期）を増加させるのが望ましいであろう。タンパク質の半減期を増加させる種々の方法が当技術分野ではよく知られているが、例えば以下の方法が含まれる。ポリエチレングリコール部分へのタンパク質の接合、即ち P E G 付加（PEGylation）（例えば、USPN 4,179,337 号；USPN 5,166,322 号；USPN 5,206,344；Nucci ら、Adv.Drug Delivery Rev.,4:133-151(1991)；Zalipsky ら、Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS を参照のこと）、デキストランへのタンパク質の共役（Maksimenko, Bull. Exp. Biol. Med., (ロシア語) 52:567-569(1986)）、およびエンドグリコシダーゼ F での処理によるタンパク質の糖除去（Lace ら、Carbohydrate Res., 208:306-311(1990)）。

一般に、これらの方法は、タンパク質の分子量を増加させ、タンパク質分解酵素に対するタンパク質の感受性を低下させ、および / または処置すべき対象者からタンパク質が排除さ

10

20

30

40

50

れる速度を低下させるようにデザインされる。修飾 h p H A s e ポリペプチドの半減期の増加によって、有効量として必要とされるタンパク質の量が減少し、必要な投与頻度が減少し、患者がこのタンパク質に曝される機会が減少し、したがってアレルギー反応、毒性作用または他の副作用の可能性が減少する。半減期が増加した修飾 h p H A s e ポリペプチドのこれらの性状によって、タンパク質の免疫原性および/または毒性に関連する望ましくない副作用の可能性を抑えて該タンパク質の長期使用が可能になる。好ましくは、これらの方法は、タンパク質の生物学的活性を実質的に損なうことなく、タンパク質の半減期を増加させるように用いることができる。h p H A s e の酵素活性は例えば本発明の h p H A s e 活性アッセイを用いて分析できる。タンパク質の生物学的半減期を検査する方法は当技術分野で周知である。

10

投与に適した具体的な用量は、上記で考察した要素にしたがって当業者によって容易に決定することができる(例えばHarrison's Principles of Internal Medicine(11版、1987)を参照のこと)。さらに、ヒトでの適切な用量の概算は、h p H A s e のインビトロでの酵素活性レベルの決定および/または動物実験で有効な用量から推論することができる。例えば、70~300 T R U のヒアルロニダーゼはscidマウスの腫瘍負荷を減少させるのに有効である。このデータが与えられた場合、平均70 k g のヒトでの対応する用量は約250,000~1,200,000 T R U の範囲のヒアルロニダーゼであろう。ヒトの患者に投与される h p H A s e ポリペプチドの量は一般に、1 T R U から5,000,000 T R U の酵素活性、好ましくは約1,000 T R U から2,500,000 T R U、より好ましくは約100,000 T R U から1,500,000 T R U の範囲、通常は約250,000 T R U から1,200,000 T R U で、平均処方用量は約725,000 T R U である。

20

ある態様として、h p H A s e ポリペプチドは、約150,000 T R U / c c の濃度での h p H A s e を含む0.15 M 食塩水溶液として調剤される。続いてこの製剤を15,000 T R U / (k g 患者の体重)で静脈内注射する。または、該酵素製剤を皮下注射して、ヒアルロニダーゼを腫瘍部位の周辺に灌流させる。好ましい態様として、h p H A s e は腫瘍周辺にまたは腫瘍塊の中に注射される。また別の好ましい実施態様では、h p H A s e をリボソームとして製剤化し、静脈内注射するかまたは L u C a - 1 (h p H A s e) 遺伝子の欠陥に関連する癌細胞部位近くに注射する。h p H A s e を静脈内注射することにより、腫瘍部位に h p H A s e がもたらされる。

癌細胞または前癌細胞における h p H A s e の発現による抗癌療法

30

ヒト染色体の3 p 2 1 . 3 における欠陥と癌との付随性は、いくつかの組織で報告されている。L u C a - 1 遺伝子(配列番号: 4)は3 p 2 1 . 3 でのいくつかの腫瘍抑制遺伝子候補の1つである。L u C a - 1 および h p H A s e の同一性、並びにヒアルロニダーゼの発現がマウスでの腫瘍進行および腫瘍形成の抑制と密接に関連するという観察(De Maeyerら、上掲書; Pawloeskiら、上掲書)は、h p H A s e をコードする L u C a - 1 遺伝子が腫瘍抑制遺伝子としての活性を有することを示唆する。したがって、L u C a - 1 / h p H A s e 欠陥を有する細胞の染色体に L u C a - 1 / h p H A s e をコードするヌクレオチド配列を導入することによって欠陥を修復し、それによって腫瘍の発育および/または進行を防止または抑制することが可能である(例えば置換遺伝子療法)。導入された h p H A s e をコードする配列は、標的細胞の形質転換時に構成的にまたは誘発的に発現される。または、L u C a - 1 / h p H A s e の欠陥は、h p H A s e の発現を強化することができる遺伝的成分を導入(例えば h p H A s e の転写または翻訳の抑制に必要な因子の抑制物質を導入)することによって修復できる。この後者のアプローチは、h p H A s e をコードする配列自体は不完全ではないが、該欠陥が h p H A s e の発現低下によって生じる場合に有用であろう。例えば、腫瘍細胞または腫瘍細胞近傍の細胞(例えば、引き続いて腫瘍細胞に暴露される h p H A s e を発現することができる細胞)の形質転換は、小型肺細胞癌、有棘肺細胞癌、並びに乳房、卵巣、頭部および頸部の癌、または低レベル h p H A s e もしくは不完全 L u C a - 1 (h p H A s e) 遺伝子(例えば適切なレベルの h p H A s e の発現を提供できない L u C a - 1 または適切なレベルのヒアルロニダーゼ活性を提供できない不完全な h p H A s e をコードする L u C a - 1 遺伝子)もし

40

50

くは h p H A s e 活性低下に伴うその他の欠陥に関連する一切の他の癌の処置に用いることができる。

遺伝子治療を実施するために問題の配列を宿主細胞に導入する方法は当技術分野では周知である。一般に、そのような遺伝子治療法には生体外と生体内での方法が含まれる。本発明の生体外遺伝子治療は、例えば患者から単離した細胞を h p H A s e ポリペプチドをコードする配列で形質転換すること、該形質転換細胞を患者に移植することを含み、それによって h p H A s e 産生の貯蔵器官を、好ましくは腫瘍内の部位にまたは腫瘍の近くに提供する。したがって、この移植細胞は分泌 h p H A s e を提供し、患者の腫瘍の進行と戦う。生体外遺伝子治療を実施する方法は当技術分野では周知である（例えば、Morganら、*Science*, 237:1476 (1987) ; Gerrardら、*Nat. Genet.*, 3:180 (1993) を参照のこと）。本発明の生体内遺伝子治療は、h p H A s e ポリペプチドをコードする核酸を生体内送達し、細胞（例えば癌細胞、前癌細胞、腫瘍周囲細胞、または h p H A s e の発現および分泌が可能な細胞、好ましくは癌細胞または前癌細胞）内に該核酸を導入し、かつ患者の形質転換細胞により h p H A s e を発現し、それによって h p H A s e 欠陥を修復することによって、患者の体内で h p H A s e の欠陥の修復を達成する。

生体外トランスフェクション法または生体内トランスフェクション法のいずれかにしたがって、細胞を形質転換させるいくつかの異なる方法を用いることができる。例えば、遺伝的物質を送達するために種々の機械的方法を用いることができるが、これらには融合誘発性脂質小胞（リポフェクチンのような陽イオン性脂質を取り込んだリポソーム、Felgnerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987)）を参照のこと；DNAの直接注入（Wolffら、*Science*, 247:1465-1468 (1990)）；遺伝子銃と称される装置を用いるDNA被覆金粒子の空気送達（Yangら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1568-1572 (1990)）；および種々のウイルスベクター（例えばアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ付随ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、ワクシニアウイルスおよびポリオウイルスの非複製性変異体/変種）が含まれる。各分野における多数の刊行物の引用とともに種々の技術の概略はヒトの遺伝子治療に関する最近の記事に含まれている（Morsyら、*JAMA*, 270:2338-2345 (1993) を参照のこと）。

遺伝子治療を実施するための製剤は、用いられる遺伝子治療の方法、投与ルート（例えば全身的遺伝子治療用投与または特定の標的細胞の形質転換用投与）および形質転換のために標的とされる部位（例えば肺、乳房または卵巣）によって変動するであろう。h p H A s e ポリペプチドをコードする核酸配列は裸出状態であるか（すなわち被包化されていない）、DNAと陽イオン化合物（例えば硫酸デキストラン）との製剤として提供されているか、またはリポソーム内に包含されていてもよい。また別には、問題のDNAは、“遺伝子銃”および当技術分野で周知の関連技術を用いて圧縮空気によって送達してもよい（Fynanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11478-11482 (1993)）。標的細胞内での h p H A s e の発現のための構築物の種々の成分（例えば選択プロモーター、発現促進成分の存在）もまた、細胞の種類および所望する h p H A s e の発現レベルにしたがって変動するであろう。

投与されるDNAの量は、標的細胞の形質転換に対する感受性、対象者の大きさおよび体重、所望される h p H A s e の発現レベルおよび処置すべき症状を含む多数の要因によって大きく変動するであろう。例えばヒトの乳癌に注射されるDNAの量は、一般に約 1 μ g ~ 200 m g、好ましくは約 100 μ g ~ 100 m g、より好ましくは約 500 μ g ~ 50 m g、最も好ましくは約 10 m g であろう。一般に、ヒトの遺伝子治療のためのDNAの量は、動物モデルにおける遺伝子治療に有効なDNA量から推論できる。例えば、ヒトの遺伝子治療のためのDNA量は大雑把に、ラットの遺伝子治療のDNA有効量の100倍である。細胞の形質転換を達成するために必要なDNAの量は、用いられる形質転換の方法の効率が増加するにしたがって減少するであろう。

h p H A s e、抗 h p H A s e 抗体、および h p H A s e ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を用いる他の多くの用途は当業者には明白であろう。h p H A s e ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ハイブリダイゼーションスクリーニング法で用い

10

20

30

40

50

て、h p H A s e と相同性を有する他のヒアルロニダーゼを検出できる。

寄託

ハイブリドーマ細胞系 1 7 E 9 および 4 D 5 (これらは、天然 h p H A s e と結合する抗 h p H A s e 抗体を産生する)は、特許を目的としてカリフォルニア大学評議員 (300 Lakeside Drive, 22nd floor, Oakland, California, 94612) に代わってアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA) に寄託されている。ハイブリドーマ細胞系 1 7 E 9 の寄託は、A T C C によって1996年10月17日に受領された (ATCC番号、ATCC HB-12213)。ハイブリドーマ細胞系 4 D 5 の寄託は、A T C C によって1996年10月17日に受領された (ATCC番号、ATCC HB-12214)。これらハイブリドーマ細胞は、微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約 (ブダペスト条約) に規定された条件にしたがって寄託された。

この寄託物質を利用することができるということを、当局がその特許法に基づいて付与した権限に違反して本発明を実施するライセンスと解してはならない。

実施例

以下の実施例は、本発明を実施する方法を完全に開示し説明するために当業者に提供するものであって、本発明の範囲を制限することを目的とするものではない。使用された数字 (例えば量、温度など) に関しては正確を期するように努めたが、ある程度の実験的誤差および偏差は存在する。特記しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。

実施例 1: 共有結合ビオチン付加ヒアルロン酸を用いるヒアルロニダーゼ (H A s e) 活性アッセイ

ヒト臍帯ヒアルロン酸 (H A ; I C N) を、ビオチンヒドラジド (Pierce) で遊離カルボキシル基を介して1-エチル-ジメチルアミノプロピルカルボジアミド (E D C , Sigma) を用いて結合させてビオチン付加した。ヒアルロン酸 (H A) 100m g を 0.1M M e s (p H 5.0) に溶解し、D M S O に溶解させたビオチンヒドラジド (Pierce) を最終濃度 1 m M で添加した。E D C は H A / ビオチン溶液に最終濃度 0.03m M で溶解し、4 で一晩攪拌した。続いて蒸留水 (d H₂O) に対して徹底的に透析して未結合ビオチンを除去し、最終濃度 1 m g / m l で -20 で保存した。

続いてヒアルロニダーゼアッセイを行う約10日前までに、スルホ-N H S (Pierce) 9.2 μ g / ウェルおよび新しい E D C 6 μ g / ウェルを用いてビオチン付加ヒアルロン酸 (b H A) を最終濃度 5 μ g b H A / ウェルでコパリンク-N H 微量定量プレート (NUNC, ニュージャージー州、Placerville) に 4 で一晩共有結合によって結合した。未結合 H A を、洗浄緩衝液 (2 M N a C l , 50m M M g S O₄, 0.05% トゥイーン 20 を含む P B S) で洗浄して除去した。血漿ヒアルロニダーゼ活性を調べるためのインキュベーションは、ヒト血漿をアッセイ緩衝液 (0.1M ギ酸塩 (p H 3.7), 0.1M N a C l , 1% トリトン X - 100, 0.02% アジド, 5 m M C a C l₂ および 5 m M サッカロラクトン (エキソグリコシダーゼ活性を抑制するため)) で 1 : 400 に希釈し、b H A プレートでサンプル 100 μ l を 37 で 30 分間インキュベートして実施した。反応は、6 M グアニジン H C l を添加して終了させ、P B S 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。

プレートに共有結合したままの残留未消化ヒアルロン酸wo、基質としてo-フェニレンジアミンを用いてアビジンペルオキシダーゼ (A B C キット、Vectastain) と反応させた。b H A と結合した蛍光を微量定量プレート読み取り装置を用いて 492 n m で検出した。段階希釈したウシ精巢ヒアルロニダーゼ (WYDASE™ (商標)) を一緒にインキュベートして標準曲線を作成し、未知サンプルの活性を 4 種パラメーター曲線に合わせて内挿し、ヒアルロニダーゼの標準化市販調製物に対して相対的濁度減少単位 (r T R U) / m l で与えられる値を得た。

b H A ヒアルロニダーゼ活性アッセイは、従来の比色アッセイ (Afifyら、上掲書) よりも約 1,000 倍感度がよく、完了まで 60 分を要するだけである。さらにまた、本アッセイは、従来の E L I S A 様アッセイで用いられるウシ鼻軟骨からの長々と時間を要するビオチン付加 H A 結合アグリカンペプチドの調製 (Sternら、上掲書; Delpechら、上掲書) を必

10

20

30

40

50

要としない。本アッセイはまた、より長いインキュベーション時間を用いることによって非常に低いレベルの活性を産生する細胞培養のH A s e活性の検出に用いることができる。

実施例 2 : 本発明の生化学的精製方法を用いるヒト血漿ヒアルロニダーゼの精製

h p H A s e を 3 工程の生化学的手順で精製した。1) ヒト血漿の温度誘発洗剤 h p H A s e 抽出; 2) ファストフロー S (Fast Flow-S) 陽イオン交換クロマトグラフィー; 及び 3) ヒドロキシルアパタイト樹脂。ヒアルロニダーゼ活性およびタンパク質濃度を各精製段階で求めて、ヒアルロニダーゼ比活性を算出した。ヒアルロニダーゼ活性は実施例 1 のアッセイを用いて決定した。タンパク質濃度を、280 nm での吸収および標準物質として結晶化ウシ血清アルブミンを使用し且つ 595 nm で読み取った 96 ウェルプレートによる

10

1) 温度誘発洗剤相抽出

U C S F またはアービン・メモリアル (Irwin Memorial) 血液ドナーセンターのいずれかから入手した期限切れヒト血漿 2 リットルを酵素精製のために日常的に用いた。冷蔵ヒト血漿 2 リットルを 0.02% アジ化ナトリウム、50 m M N a C l、5% ショ糖および 7.5% トリトン X - 1 1 4 (Boehringer Mannheim) の溶液に攪拌しながら 4 で溶解させ、続いて 10,000 × g で 30 分間遠心沈殿して不溶性物質を除去した。続いて、血漿を 37 で温度誘発相抽出に付し、洗剤濃厚相および洗剤希薄相を分離させた。抽出物を 37 で 10,000 × g で 30 分間遠心沈殿して 2 つの相を透明にした。洗剤濃厚相を取り出し、冷 50 m M H e p e s (p H 7.5) と 0.15 M N a C l で 2 リットルに希釈した。続いてこの溶液を氷上で十分に混合し、その後 37 で再度分配を実施し遠心した。洗剤相に分配されるヒアルロニダーゼの比活性を高めるためにこの操作を 3 回繰り返した。最終洗剤濃厚相では、実施例 1 の H A s e 活性アッセイで求めたときヒト血漿出発材料と比較して h p H A s e の比活性は 60 倍濃縮された。

20

2) ファストフロー S 陽イオン交換クロマトグラフィー

25 m M M e s (p H 6.0) 中の平衡化 S P - セファローズ陽イオン交換樹脂 (Pharmacia) 20 m l で、工程 1 の最終洗剤濃厚相を 6 倍希釈し、4 で一晩攪拌した。ビーズを遠心沈殿して採集し、46 m m オクチルグリコシド (Boehringer Mannheim) を含む 25 m M M e s (p H 6.0) で徹底的に洗浄した。ヒアルロニダーゼを、M e s (p H 6.0) 緩衝液に 0.3 M N a C l を添加して数回洗浄しつつビーズから溶出させた。S P - セファローズ溶出液を Y M 3 (Amicon) 膜上で濃縮し、f.p.l.c. ファスト脱塩カラム上で 25 m M N a C l、46 m M オクチルグリコシドを含む 10 m M P O₄ (p H 7.4) 中に脱塩した。

30

3) ヒドロキシル - アパタイト樹脂

工程 2) のヒアルロニダーゼ調製物を平衡化ヒドロキシルアパタイト樹脂 (Biorad) 10 m l と混合し、4 で一晩攪拌台に放置した。h p H A s e はこのような条件下では樹脂に吸着されず、上清から回収された。上清から回収した h p H A s e を、ファルマシア・ファストゲルシステム (Pharmacia Phast Gel System) の銀染色 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動分析により測定したとき均一になるまで精製した。

表 1 は、上記の各精製工程の h p H A s e 含有分画のヒアルロニダーゼ活性、タンパク質濃度および比活性をまとめたものである。

40

表1. h p H A s e の生化学的精製

精製工程	容積 (ml)	活性 (rTRU/ml)	蛋白質 (mg/ml)	比活性 (rTRU/mg)	精製度 (×倍)
出発材料 (ヒト血漿)	2100	35	86	0.406	1.0
1) 最終洗剤相	650	33	1.3	25.4	63
2) Fast Flow-S 陽イオン交換	60	298	0.85	350.6	875
3) ヒドロキシルー アパタイト (未結合)	15	907	0.0015	6.0×10^5	1.5×10^6

生化学的 h p H A s e 精製の結果の要約

上述の生化学的な方法を用いる h p H A s e の精製によって、h p H A s e は温度誘発洗剤相への分配について固有の特性を有することが明らかになった。洗剤濃厚相への h p H A s e 分配は、通常ある種の内在性膜タンパク質 (integral membrane proteins) または脂質固着タンパク質とともに観察される (Bordier, J. Biol. Chem., 256:1604-7 (1981))。ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (これはグリコシル - ホスファチジルイノシトール (G P I) アンカーを切断する) または N-グリコシダーゼ F (これは N 連結糖付加部分を切断する) により h p H A s e を処理しても、h p H A s e の h p H A s e 分配特性が変化しない (しかしゲルザイモグラフィと組み合わせた N-グリコシダーゼ F 処理は、h p H A s e が少なくとも 2 つの N 連結糖付加部位をもつことを示した)。これらの実験から、h p H A s e が内在性膜タンパク質であるか、またはヒト赤血球アセチルコリンエステラーゼの G P I アンカーと同様なホスホリパーゼ耐性アンカーをもつことが示唆される (Roberts ら、J. Biol. Chem., 263:18766-75 (1988))。G P I アンカーは、形質膜の細胞外領域上に存在するタンパク質と通常は結合しているが、血清に存在する G P I 固着タンパク質の例もある (例えば C D 5 9、Vakeva ら、Immunology, 82:28-33 (1994))。さらに、中性 P H 2 0 精子ヒアルロニダーゼのいくつかは G P I 特異的ホスホリパーゼ C 感受性アンカーを有する (Gmachl ら、FEBS Lett., 336:545-8 (1993); Thaler ら、Biochemistry, 34:7788-95 (1995)) が、G P I アンカー様翻訳後修飾は酸活性ヒアルロニダーゼでは報告されていない。のみならず、そのような翻訳後修飾は、アミノ酸配列またはそのような酸活性ヒアルロニダーゼをコードするヌクレオチド配列からは明らかではないだろう (すなわち、脂肪酸または G P I アンカーの付加による翻訳後修飾の特異的部位は報告されていない)。例えば、G P I 固着タンパク質についてコンセンサス配列は現在のところ知られていない。イソプレニル化タンパク質のコンセンサス配列 (C A A X ; 配列番号 : 10) は知られているが、h p H A s e はこの配列を含まない。

h p H A s e は他の強力な両親媒性性状を示した。例えば、h p H A s e を溶解させた溶液のイオン強度が透析によって低下するとき、h p H A s e は溶液から沈澱した。h p H A s e は、0 ~ 30% の硫酸アンモニウム分画に豊富であった。h p H A s e のコンカバリオン A 結合特性から、h p H A s e がマンノース含有糖タンパク質であることがわかった。中性 p H での S200-f.p.l.c. カラム (Pharmacia) によるゲル濾過クロマトグラフィは、約 120 k D a でボイド容積内に H A s e 活性のピークを溶出させた。ゲル濾過クロマトグ

10

20

30

40

50

ラフィーを非イオン性洗剤の非存在下で実施したとき、H A s e 活性のピークは約60 k D aで溶出した。h p H A s e 活性に付随する分子量におけるこの違いは、おそらく洗剤の存在下でのh p H A s eの凝集またはオリゴマー化(例えば分子内結合による)によるものであろう。h p H A s eは非イオン製洗剤の存在下で37 で非常に安定であり、したがってトリトンX - 1 1 4相抽出は、ほとんどの血漿タンパク質が洗剤濃厚相に分配されないのので特に、最初の分画工程として理想的である。

洗剤を除去しさらにh p H A s eを精製する陽イオン交換クロマトグラフィーの間、非イオン性洗剤を添加することおよび少なくとも50mMでN a C lを維持することは酵素の沈澱を防止するために必須である、パッチ吸着クロマトグラフィーはカラムクロマトグラフィーと比較して活性を保存した。興味深いことには、60mMオクチルグリコシドの存在下、10k D aカットオフ膜でh p H A s e含有調製物を濃縮したとき、h p H A s e活性は保持されなかった。しかしながら、3k D aカットオフ膜を用いることによってh p H A s e活性は保持された。これらの結果から、h p H A s eのストークス径は球形モデルから実質的に逸れていることが示唆される。これらのデータから、ほとんどの球形タンパク質について考えられているように、h p H A s eはオクチルグリコシド洗剤の存在下で球形をもたず、むしろロッド状形態をとるらしいことを示している。h p H A s eは、1つの寸法では57k D aタンパク質より6~7k D aタンパク質の分子量を有するようである。したがって、一つの寸法ではこのタンパク質は、小型タンパク質およびペプチドのために設けられた障壁を通過することができ、このことから血漿酵素がヒト尿中で見出されることが説明できるであろう(下記参照、通常腎臓は50~60k D a未満(<50~60k D a)のタンパク質を排除する)。したがって、患者は、h p H A s eがリボソームまたはリボソーム様構造に取り込まれない場合、尿中に大量のh p H A s eを排出するかもしれない。h p H A s eのS P - セファロース後調製物は、不純物タンパク質をヒドロキシアパタイト樹脂に吸着させて均一になるまで精製して、全体として150万倍の精製度が得られた。この最終精製工程から得たh p H A s eサンプルのS D S - P A G E電気泳動および銀染色によって単一バンドが得られ、このことは、h p H A s eは電気泳動上均一になるまで精製されたことを示している。精製した酵素の比活性(実施例1で述べたアッセイを用いて検査したとき600,000rTRU/mg)は、精子ヒアルロニダーゼP H 2 0で報告された値のほぼ6倍であった。最終調製物中の非イオン性洗剤レベルによって分子質量分析は変動したが、精製した酵素はS D S電気泳動ゲルで相対分子質量57k D aで移動した。

実施例3：抗天然酸活性H A s e (a a H A s e) 抗体のためのスクリーニングアッセイ

ビオチン付加H A (b H A) を実施例1で述べたように調製した。b H A約5 μ g / ウェルおよびヤギ抗マウスI g G (Jackson Immunolabs) 1.25 μ g / ウェルを、スルホ - N H S (Pierce) 9.2 μ g / ウェルおよび新しいE D C 6 μ g / ウェルを有するコバリンク - N H微量定量プレート(NUNC , ニュージャージ州、Placerville) に4 で一晚共有結合によって接合した。未結合H Aおよびヤギ抗体は、洗浄緩衝液(2 M N a C l , 50mM M g S O ₄ , 0.05% トウィーン20を含むP B S) でプレートを洗浄して除去した。

抗天然酸活性H A s e (抗天然 a a H A s e) 抗体は、候補抗体を酸活性H A s eを含むサンプルと中性p H緩衝液(これはリン酸緩衝食塩水(P B S)中に1%トリトンX - 1 0 0を含む)中でインキュベートしてスクリーニングした。サンプルが希釈サンプルの場合(例えば希釈血漿サンプル)、中性p H緩衝液はさらに5 m g / m lウシ血清アルブミン(B S A)を含んでいた。a a H A s e含有サンプルを候補抗体とインキュベートして、天然a a H A s e - 抗体複合物を形成させた。続いてサンプルをb H A / 抗マウス抗体ウェルに入れてインキュベートし、中性p H緩衝液中で抗マウス抗体 / 抗天然a a H A s e / a a H A s e抗体を形成させた。a a H A s eを結合しない抗体を含むサンプルは陰性コントロールとして用いることができる。

天然a a H A s eと結合する抗体の検出は、先ず未結合物質を中性p H緩衝液で洗浄し、続いて中性p H緩衝液を実施例1で述べたH A s e活性アッセイで用いた酸性アッセイ緩衝液(0.1Mギ酸塩(p H 3.7) , 0.1M N a C l , 1%トリトンX - 1 0 0 , 0.02%アジド、5 m M C a C l ₂および5 m Mサッカロラクトン)で置き換えて実施した。中性から

10

20

30

40

50

酸性へのpHシフトによって、一切の結合 a a H A s e の H A s e 活性が共有結合 b H A を分解する。反応を 6 M グアニジン H C l を添加することによって終了させ、P B S 洗浄緩衝液 (P B S 、 2 M N a C l 、 50 m M M g S O ₄ 、 0.05 % トウイン 2 0) で 3 回洗浄した。b H A の分解は、基質として o-フェニレンジアミンを用いてアビジンペルオキシダーゼとウェルを反応させ、実施例 1 で述べたように 492 n m でプレートを読み取って検出した。抗天然 a a H A s e 抗体は b H A の分解によって同定された。本アッセイは、a a H A s e が p H 4.5 以上では H A 基質に対して親和性をもたない (これは h p H A s e による H A - セファロース親和性クロマトグラフィーによって決定されたが、結果は示されていない) という a a H A s e の特性を利用している。

実施例 4 : 抗 h p H A s e モノクローナル抗体の生成と同定

実施例 2 の精製法のヒドロキシアパタイト後工程から単離した h p H A s e を用いて、当技術分野で周知の方法にしたがって 5 匹の 6 週齢雌 B a l b - c マウスを免疫した (例えば上掲書 (Harlow & Lane) 参照)。簡単に記せば、h p H A s e をフロイントの完全アジュバントと混合しマウスに腹腔内注射した。21 日間隔で、タンパク質 + フロイントの不完全アジュバントを動物に追加免疫した。フロイントの不完全アジュバントに h p H A s e を含む第 4 回目と最終追加免疫は静脈内注射した。血清サンプルを採り、マウスを殺処分して周知の方法 (Harlow & Lane、上掲書 ; Schrier ら、上掲書) にしたがってハイブリドーマ細胞系を調製するために 5 匹のうちの 2 匹から脾臓細胞を単離した。b a l b / c 細胞の融合は s p 2 / 0 ミエローマを用いて実施した。

抗体分泌ハイブリドーマを、実施例 3 で述べた本発明の抗天然 a a H A s e 抗体アッセイを用いてスクリーニングした。簡単に記せば、20 の融合プレートのハイブリドーマ上清を希釈ヒト血漿と 37 °C で 60 分間インキュベートし、続いて b H A / 抗マウス I g G プレート中で 37 °C で 60 分間インキュベートした。1 % トリトン X - 1 0 0 および 10 m g / m l B S A を含む P B S でプレートを 5 回洗浄し、免疫沈澱しなかったヒアルロニダーゼを除去した。続いて酸性ギ酸塩アッセイ緩衝液 (p H 3.7) をウェルに添加し、37 °C で 60 分間インキュベートした。6 M グアニジンで反応を停止させた後、実施例 3 で述べたように、基質として o-フェニレンジアミンを用いアビジンペルオキシダーゼとウェルを反応させ、492 n m でプレートを読み取ってウェルに残留する未分解 b H A を検出した。

8 クロウンを最初の 20 ハイブリドーマ融合プレートから同定した。2 クロウン、1 7 E 9 (I g G ₂ クラス抗体、カップ鎖を産生) および 4 D 5 (I g G ₁ クラス抗体、カップ鎖を産生) を用いて腹水を得た。単一細胞によってクローン化したハイブリドーマ系の腹水由来免疫グロブリンを B a l b / c マウスで生成し、タンパク A 親和性クロマトグラフィーによって精製した。1 7 E 9 抗体も 4 D 5 抗体も h p H A s e 活性をブロックしなかった。1 7 E 9 抗体は免疫親和性精製および免疫沈澱での使用が好ましい。4 D 5 抗体は免疫組織化学での使用が好ましい。

実施例 5 : 1 7 E 9 モノクローナル抗体を用いる h p H A s e の免疫沈澱

1 7 E 9 抗天然 h p H A s e クロウン由来精製 I g G 2a またはコントロール I g G 2a 非特異的抗体のいずれかを用いて、h p H A s e をヒト血漿から免疫沈澱させた。ヒト血漿を R. I. P. A. 緩衝液 (1 % N P 4 0 、 1 % デオキシコレート、1 % トリトン X - 1 0 0 、 5 m M E D T A を含む P B S) で希釈した。コントロール I g G 2a 抗体または 1 7 E 9 抗体のいずれかの段階希釈と接合させたタンパク質 A セファロースをサンプルに加えた。未結合物質を遠心沈殿によってピーズから分離し、上清に残留する H A s e 活性を実施例 1 で述べたアッセイを用いて検出した。図 4 に示すように、1 7 E 9 抗体による免疫沈澱によって本質的に全ての検出可能な酸活性ヒアルロニダーゼ活性が除去された。さらに、1 7 E 9 抗体はウシ精巢ヒアルロニダーゼ (P H 2 0) とは結合しなかった。このことは、1 7 E 9 が、P H 2 0 及び h p H A s e と共有する炭化水素部分または他の部分とは結合しないことを示唆している。

実施例 6 : h p H A s e の免疫親和性精製

親和性クロマトグラフィーカラムに結合させた 1 7 E 9 抗体を用いて、h p H A s e を単一工程で未加工ヒト血漿から均質となるまで精製した。1 7 E 9 ハイブリドーマクローン

10

20

30

40

50

の腹水から得た精製 I g G 約 3 m g をハイトラップ N H S (High Trap-NHS) 活性化カラム (Pharmaci) 1 m l に製造元の指示にしたがって結合させた。h p H A s e 血漿を R. I. P. A. 緩衝液で 1 : 2 に希釈し 1 7 E 9 I g G 抗体カラムに通した。続いてカラムを 2 M N a C l と 100 m M オクチルグルコシドを含む P B S で洗浄し、続いて 100 m M クエン酸塩 (p H 4.0) で洗浄した。h p H A s e を 150 m M N a C l を含む 100 m M クエン酸塩 (p H 3.0) で溶出させた。h p H A s e は明瞭な均一ピークとして p H 3.0 で溶出した。免疫親和性精製 h p H A s e の比活性は約 4.0×10^5 r T R U / m g の範囲であった。したがって、生化学的精製工程と比較して存在するとしても極めてわずかな活性が免疫親和性精製工程で失われる。さらにまた、免疫親和性精製は、サンプル中の h p H A s e の約 100 % の h p H A s e の回収をもたらした。すなわち、H A s e アッセイでは未結合分画中に残留する H A s e 活性は検出されなかった。

10

実施例 7 : h p H A s e のアミノ酸配列決定

実施例 6 の免疫親和性精製 h p H A s e 約 50 μ g を L y s - C (N 末端フラグメントを生成するため) またはトリプシン (内部フラグメントを生成するため) で消化し、Vydac C-18 逆相カラム上でクロマトグラフィーを実施してフラグメントを分離した。精製ペプチドの配列をガス相エドマンシーケンサーで配列決定した。N 末端アミノ酸の配列決定のためには、精製タンパク質をプロソープ (Prosorb) 膜 (ABI) に固定した。N 末端アミノ酸の配列決定は、ガス相エドマン分解を用いて自動化タンパク配列決定によって実施した。精製 h p H A s e (配列番号 : 1) の L y s - C 消化物に由来する N 末端のアミノ酸配列および 5 つの断片内部アミノ酸配列のファスタ調査 (Pearson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 85:2444-8 (1988)) から、L u C a - 1 遺伝子 (配列番号 : 3、GenBank 受託番号 u03056) の予想アミノ酸配列と同一であることを明らかにした。

20

実施例 8 : L u C a - 1 / h p H A s e の性状

上記の実施例 7 で述べたように、h p H A s e は L u C a - 1 と同一である。L u C a - 1 遺伝子は、小型細胞肺癌系では 100 % のヘテロ接合型消失を示す染色体 3p.21.3 に位置する 17 個の配列を含む一群の中の 1 つである (Dietrich ら、Clin. Chim. Acta, 13:746-52 (1966))。L u C a - 1 を含む領域に広がる 3 p . 2 1 の欠失はまた、非小型細胞肺癌、乳癌、前立腺、並びに頭部および頸部の癌でも報告されている。モノ - P f . p . l . c システム上での h p H A s e のクロマトフォーカシングは、h p H A s e (配列番号 : 1) および L u C a - 1 (配列番号 : 3) の同一性に関して更なるデータを提供した。h p H A s e は p H 6.5 で溶出し、これは L u C a - 1 の算出等電点理論値 6.58 と非常に近い。

30

L u C a - 1 (配列番号 : 3) およびヒト精巢ヒアルロニダーゼ P H 2 0 (配列番号 : 11) のアミノ酸配列のピアソン・リップマンライメント (Pearson ら、上掲書) は、L u C a - 1 および P H 2 0 が 40 % を越える配列同一性および 60 % 相同性を共有することをわかった (図 5)。P H 2 0 はもっぱら精子特異的中性ヒアルロニダーゼであり、ミツバチおよびスズメバチ (yellow jacket vespid) の毒液に見出される毒液ヒアルロニダーゼと顕著な相同性を共有する (Gmachl ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3569-73 (1993))。厳格な酸活性をもつ血漿ヒアルロニダーゼ (L u C a - 1 / h p H A s e) と P H 2 0 との間の際立った相同性は、それらの最適 p H が非常に異なることを考えるならば驚くべきことであり、このことから、全てのホ乳類の 1-4 ヒアルロニダーゼが、中性も酸性も双方共に高度に保存された酵素類の構成メンバーであることが示唆される。

40

L u C a - 1 / h p H A s e のハイドロパシープロットは疎水性に富むドメイン (例えば内在性膜タンパク質に付随しているようなもの) を全く示さず、これにより、実施例 2 で述べた h p H A s e の相分配特性が説明できるであろう。したがって、これらのデータは、L u C a - 1 / h p H A s e の洗剤濃厚相への分配は翻訳後修飾 (例えば脂肪酸鎖の修飾またはホスホリパーゼ C / ホスホリパーゼ D / N - グリコシダーゼ F 耐性 G P I アンカー) のためであるということを示唆している。

実施例 9 : L u C a - 1 / h p H A s e をコードする D N A の単離

gt10 5' -STRETCH PLUS ヒト肝 c D N A ライブラリー (Clontech Laboratories, Inc., アメリカ、カリフォルニア州、パロアルト) を用いてネスト P C R 反応を 2 巡し、L u C

50

a - 1 コード配列をコードする c D N A を単離した。1 巡目の P C R (ここでは L u C a - 1 c D N A の 590 から 1948 までのヌクレオチドを増幅させた) では以下のプライマーを用いた。L u C a F 1 (5' -CAGGTTGTCCTGCACCAAGTC-3') (配列番号: 5) および L u C a R 1 (5' -ATGTGCAACTCAGTGTGTGGC-3') (配列番号: 6)。P C R 反応は、肝 c D N A ライブラリー 1 m l、25 m M プライマー各 1 m l、10 m M d T N P 1 m l (Gibco BRL, アメリカ、ニューヨーク州、グランドアイランド)、2 単位の P f u D N A ポリメラーゼ (Stratagene Cloning Systems, アメリカ、カリフォルニア州、ラホイヤ) を含み、10 m M トリス - H C l、50 m M K C l および 2 m M M g C l₂ で緩衝化させた全反応容積 50 m l 中で実施した。P C R 反応条件は、95 °C で 1 分間の変性工程、60 °C で 1 分間のアニーリング工程、および 74 °C で 1 分間の伸長を 37 サイクル、続いて最後に 74 °C で 7 分間の伸長を含んでいた。

第 2 巡目の P C R 増幅は、以下のネスト P C R プライマーを用いて L u C a - 1 コード c D N A の 612 ~ 1925 ヌクレオチドを増幅させるために用いた。L u C a F 2 (5' -GTGCCATGGCAGGCCACC-3') (配列番号: 7) および L u C a R 2 (5' -ATCACCATGCTCTTCCGC-3') (配列番号: 8)。プライマー L u C a F 2 は、その後の P C R 生成物の一方向性クローニングを促進するために P C R 反応の前にリン酸化した。リン酸化は、25 m M L u C a F 2 2 m l を 10 単位の T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ、10 m M A T P (50 m M トリス - H C l (pH 7.5)、10 m M M g C l₂、5 m M ジチオスレートールで緩衝) 1 m l および最終容積 9 m l の 0.1 m M スペルミジンとともにインキュベートすることによって実施した。反応は、鋳型として最初の P C R 反応から得た最終生成物の 1 m l、リン酸化 L u C a - 1 F 2 4 m l、25 m M L u C a R 2 1 m l、10 m M d N T P 1 m l (Gibco BRL) (10 m M トリス - H C l、50 m M K C l および 1.5 m M M g C l₂ で緩衝)、および 0.5 単位の T a q D N A ポリメラーゼ (Gibco BRL) を含む全容積 50 m l 中で実施した。第二の P C R 反応は、95 °C で 1 分間の変性、58 °C で 1 分間のアニーリングおよび 72 °C で 1 分間の伸長から成るものを 7 サイクル、さらに 72 °C で 7 分間の最終伸長が続いた。

一方向性の T A 発現ベクター pCR3.1-Uni (Invitrogen, アメリカ、カリフォルニア州、サンディエゴ) 2 μ l に P C R 反応の生成物を T 4 D N A リガーゼで連結した。この連結ベクターを用いてワン・ショット (One Shot™) T O P 1 0 F ' (Invitrogen) コンピテント細胞を形質転換し、これを 50 μ g / m l のアンピシリンを含む L B 寒天平板に播種し 37 °C で一晩インキュベートした。コロニーは、50 μ g / m l のアンピシリン含有 10 m l L B ブロスでコロニーを一晩培養し、さらにウィザード (商標) プラスミニプレップ D N A 精製システム (Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification System, Promega Corporation, アメリカ、ウィスコンシン州、マジソン) によってプラスミドを精製し、続いて DraIII エンドヌクレアーゼ (Boehringer Mannheim, アメリカ、インディアナ州、インディアナポリス) でベクターの制限地図を作製し、A B I プリズム (Prism™) D N A シーケンサーで自動蛍光配列決定を実施することによって L u C a - 1 挿入物の存在について検査した。

DraIII により制限地図作製およびプラスミドの配列決定によって、このクローン化された配列が、N 末端に見出された Val₂₇ - Leu の置換を除いて GenBank データベースで入手できる L u C a - 1 配列と同一であることが示された。肝 gt10 c D N A ライブラリーから得られた活性 P C R 生成物の配列決定によって、27 番目のアミノ酸残基に対応する位置における得られた配列と既に報告された L u C a - 1 配列との間の G - C 不一致が明らかになった。したがって、既に報告された L u C a - 1 配列がエラーを含むのか、本明細書で配列決定したクローンが対立遺伝子変種であるのかのいずれかである。

実施例 10: C o s - 7 細胞での組換え L u C a - 1 の発現

インスリン、トランスフェリンおよびセレニウム (Gibco BRL) を含む非必須アミノ酸 (U CSF 細胞培養施設) を有する D M F / F 1 2 の 50 / 50 混合物 20 m l 中にリポフェクタミン (Lipofectamine) 60 μ l とともに D N A 9 μ g を用いて、T 7 5 フラスコ内の細胞集中度 50 % の c o s - 7 細胞に、pCR3.1-Uni 発現プラスミド内の精製 L u C a - 1 をコードする c D N A を 5 時間トランスフェクトさせた。続いてこのトランスフェクト細胞を 10 % ウ

10

20

30

40

50

シ胎児血清含有DME/F12の50/50混合物中でさらに48時間増殖させた。

実施例11: Cos-7細胞で発現した組換えLuCa-1の精製と性状決定

抗天然hpHase抗体と結合する能力および酸活性Hase活性を示す能力によってLuCa-1がhpHaseと同一であることをさらに証明するために、組換えLuCa-1の性状をさらに調べた。上述したように組換えLuCa-1をcos-7細胞で発現させ、以下の実験に付した。1)抗hpHase抗体を用いたHase活性アッセイ; 2)抗天然hpHase抗体を用いたLuCa-1の免疫沈澱; 3)抗天然hpHase抗体沈澱LuCa-1のゲルゼイモグラフィ; および4)LuCa-1付随酸活性Hase活性の最適pHの決定。陰性コントロールとして機能するクロラムフェニコルトランスフェラーゼ遺伝子を含むpCR3.1-Uniベクターの9μgを細胞にトランスフェクトした(偽トランスフェクション細胞)。

10

酵素捕捉アッセイで抗hpHase抗体を用いる組換えLuCa-1のHase活性

hpHaseを発現するcos-7細胞およびそれらの細胞の条件付け培養液を別々に、実施例2で述べたように2%トリトンX-114で抽出し、続いて温度誘発洗剤相を分離した。実施例1の酵素免疫捕捉アッセイを用いて、洗剤濃厚相抽出物をHase活性について分析した。細胞層および条件付け培養液の両方のトリトンX-114洗剤相抽出物が、本発明のアッセイで検出したとき酸活性Hase活性を含んでいた(図7A)。偽トランスフェクションコントロール細胞は、低レベルの検出可能な酸活性Hase活性を示した(図7)。

組換えhpHaseのHase活性をさらに評価するために、Cos-7細胞の形質転換について上述したものと同様な態様で、HEK293細胞をhpHaseコードDNAで安定的にトランスフェクトした。簡単に記せば、リポフェクチン60μlを有するDNA9μgを用いてhpHaseをコードする構築物をHEK293細胞にトランスフェクトした。48時間後、限界希釈法を用いて500μg/ml G418を有する24ウェルプレートに細胞を播種した。14日後に、耐性コロニーの条件付け培養液を上記ようにヒアルロニダーゼ活性についてアッセイした。高レベルの発現を有するコロニーを更なる性状決定のために増殖させた。組換えhpHaseの分析は、血清非含有培養液中でhpHaseをコードする構築物を過剰発現するHEK293細胞系を48時間増殖させることによって行った。条件付け培養液は17E9抗hpHase免疫親和性カラムに通した。組換えhpHaseを上記のプロトコルを用いて溶出させた。図7Bに示すように、細胞層も条件付け培養液も酸活性hpHase活性を含んでいた。偽トランスフェクション細胞は検出可能なヒアルロニダーゼ活性を示さなかった。

20

30

これらのデータはLuCa-1が酸活性Hase活性を示すため、hpHaseとLuCa-1は同一であるという観察がさらに支持される。

抗hpHase抗体による組換えLuCa-1の免疫沈澱

タンパクAセファロースに結合させた実施例4で述べた17E9抗hpHaseモノクローナル抗体を用いて、抗天然hpHase抗体とLuCa-1との結合を実施例5で述べた免疫沈澱法で調べた。17E9抗体は、LuCa-1発現細胞由来のLuCa-1も条件付け培養液由来のLuCa-1も免疫沈澱させた。しかしながら、偽トランスフェクション細胞の酸活性Hase活性は17E9抗体-タンパクAセファロースビーズでは免疫沈澱しなかった。これらの実験から、hpHase及びLuCa-1は17E9抗天然hpHase抗体が結合する抗原エピトープを共有することがわかる。さらに、17E9が偽トランスフェクションcos-7細胞によって発現される酸活性Haseとは結合しなかったため、このエピトープはhpHaseおよびLuCa-1に固有である。

40

抗hpHase抗体で免疫沈澱させたLuCa-1のゲルゼイモグラフィ

17E9抗天然hpHase抗体で免疫沈澱させた組換えLuCa-1も、当技術分野で周知の方法(Afifyら、上掲書)にしたがって基質ゲルゼイモグラフィで酸活性Hase活性について調べた。簡単に記せば、LuCa-1トランスフェクション細胞(テストサンプル)および偽トランスフェクション細胞(クロラムフェニコルトランスフェラーゼをコードするプラスミド; 陰性コントロール)の細胞溶解物および条件付け培養液を、

50

タンパクAセファロースビーズに結合させた抗天然h p H A s eで免疫沈澱させた。サンプルをSDSサンプル緩衝液に懸濁し、40 μ g/ml HAを含む10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。免疫沈澱h p H A s e（実施例5）を含むサンプルおよびウシ精巢ヒアルロニダーゼ（WYDASETM（商標）150rTRU/ml）は陽性コントロールとして作用した。インキュベーションはAfifyら（上掲書）の記載にしたがって実施し、消化HAは、アルシアンブルー（Alcian blue）/酢酸で染色し続いてアルシアン/炭水化物染色を強化し、タンパク質を可視化するためにクマシー染色を実施することによって検出した。SDS-HAゲルの透明領域は、免疫親和性精製h p H A s e調製物と同じ相対分子質量に相当した。透明帯（したがって免疫沈澱酸活性ヒアルロニダーゼ活性）は偽トランスフェクション細胞サンプルでは観察されなかった。

10

組換えLuCa-1のHAse活性の最適pH

実施例1で述べたHAse活性アッセイを用いて組換えLuCa-1HAse活性の最適pHを決定した。アッセイ緩衝液が、0.1Mギ酸塩（pH3~4.5）、酢酸塩（pH5.0）、Mes（pH6.0）、Hepes（pH7.0~8.0）、0.1M NaCl、1%トリトンX-100、0.02%アジド、5mM CaCl₂および5mMサッカロラクトンで構成されていたことを除いて、実施例1のHAse活性アッセイを既に記載したように実施した。シグマVI-S型精巢ヒアルロニダーゼ（3,000TRU/mg固形）（これは中性HAsePH20（pH7.5で最大HAse活性）を含む）を比較として用いた。このサンプルのためのアッセイ緩衝液を、NaClを含まないで調製したという点を除き（NaClは中性HAse活性を抑制する）、VI-S型サンプルを同じように処理した。図8に示したように、組換えLuCa-1の最適pH曲線は、免疫親和性精製h p H A s eと同じ厳密な酸活性プロファイルを示した。LuCa-1もh p H A s eもpH4.5より上ではHAse活性を示さず、対照的にVI-S型精巢ヒアルロニダーゼはpH7.5より上でのみHAse活性を示した。

20

要約すれば、生化学的、分子のおよび免疫学的基準から、LuCa-1およびh p H A s eが同一であることが強く示唆される。

実施例12：LuCa-1/h p H A s eの器官調査とLuCa-1/h p H A s eの一過性発現

LuCa-1 cDNAの1.3kbのコード領域を増幅するために用いた実施例11で述べたプライマーを用いて、当技術分野で周知の方法にしたがってLuCa-1/h p H A s e転写物の組織分布を調べた。種々の組織のgt10 cDNAライブラリーから得た増幅PCR生成物は、心臓、腎臓、肝臓、肺、胎盤および骨格筋で検出されたが、脳では検出されなかった。心臓組織は、最も高レベルのLuCa-1/h p H A s e転写物産生の1つであることを示した。

30

上述したものと同様な手順にしたがって、本発明のh p H A s eと実質的に同じ配列を有する他のヒアルロニダーゼを精製し、クローニングし、さらに発現させることができる。

実施例13：尿由来のh p H A s e型の生化学的精製

期限切れヒト血漿に代わってサンプルとして濃縮尿を用いた点を除いて、実施例2で述べた生化学的精製方法にしたがって尿型h p H A s eをヒトの尿から精製した。尿h p H A s eは、h p H A s eと同様な態様で洗剤濃厚トリトンX-114相に分配される。これは、尿h p H A s eがh p H A s eの脂質修飾と同様な脂質修飾を含むことを示唆している。尿h p H A s eの等電点は、モノ-Pf.p.l.cでのクロマトフォーカシングで溶出させて決定したとき6.5である。ヒト尿h p H A s eは抗天然h p H A s e抗体17E9で免疫沈澱した。

40

ゲルザイモグラフィでは粗血漿および尿サンプルで2本のHAse活性のバンドが示された。血漿では、HAse活性は57kDaおよび46~47kDaに相当する2本のバンドとして検出された。57kDaバンドが主要な種であった。尿では、HAse活性はまた57kDaおよび46~47kDaに相当する本のバンドとして検出された。しかしながら、いずれの種も優勢ではなかった（すなわちバンドは尿サンプルでは等しい濃さで出現した）。これらのデータから、h p H A s eおよび尿h p H A s eがそれぞれ血漿および尿に2つの

50

異なる修飾形で存在するか、または尿および血漿に存在する2つの異なる酸活性H A s eがあるということを示唆している。

実施例14：転移由来癌におけるh p H A s eの発現

上記実施例5で述べた免疫沈澱アッセイを用いて17E9免疫反応性h p H A s e活性レベルの性状を調べることによって、ヒト血漿ヒアルロニダーゼの産生についていくつかの癌腫系(SCC 10A, SCC 10B, HSC-3, NIC H740, およびDMS 153)を調査した。h p H A s eレベルを条件付け培養液および細胞層自体の両方で調べた。ヒトの正常な包皮のケラチノサイトを陽性コントロールとして用いた。SCC 10A細胞株は原発性喉頭癌腫瘍に由来し、SCC 10B細胞株は同じ患者のリンパ節転移に由来する。HSC-3細胞株はリンパ節転移由来であり、NIC H740細胞株はh p H A s eをコードする染色体3p21.3の領域のホモ接合型欠損を含む小型細胞肺癌である。DMS 153細胞株は古典的小型肺細胞癌株(小型肺細胞癌変種細胞株とは異なる)である。

10

図9に示すように、SCC 10A細胞株は、正常なh p H A s eケラチノサイトのh p H A s e活性レベルに匹敵する活性レベルを産生するが、同じ患者のリンパ節転移(SCC 10B)の活性レベルは細胞層でも条件付け培養液でも完全に存在しない。HSC-3由来細胞株は検出可能なh p H A s e活性を示さなかった(用いたh p H A s e活性アッセイは正常なケラチノサイトで見出された活性の少なくとも1/100を正確に検出することができる)。小型細胞肺癌株は、NIC H740もDMS 153も検出可能な活性を示さなかった。NIC H740およびDMS 153細胞はまた検出可能なh p H A s eコード転写物を一切産生しなかった(結果は示さず)。これらのデータから、h p H A s eの消失が腫瘍発生と強力に関連していることが示唆される。本発明者らは、機能的な血漿ヒアルロニダーゼ遺伝子産物を生成する転移性癌を全く同定できなかった。原発性癌由来のいくつかの非転移性株は機能的な活性を有する。このことから酵素機能の完全な消失は腫瘍転移に付随していることが示唆される。

20

実施例14：収量が改善された組換えh p H A s e発現系

培養上清に高収量のh p H A s eを産生する組換えh p H A s e発現系を開発した。h p H A s eをコードするDNAを、CMVプロモータ駆動PCR3.1Uniベクター(Invitrogen)に機能可能に挿入した。続いてこのh p H A s eをコードする構築物を用いて当技術分野で周知の方法にしたがってHEK細胞を形質転換した。その後、37、5%CO₂でDMEM H21(4.5g/lグルコース)、10%FBS培養液中でHEK細胞をT225cm²フラスコで増殖させた。条件付け培養液を細胞から採集しh p H A s eレベルを調べた。未加工血漿に匹敵する収量をもつ組換え血漿生成物を製造するにはしばしば固有の困難が存在するが、ここで述べる本組換えh p H A s e発現系は、未加工h p H A s e血漿のコーン(Cohn)分画I相(当技術分野で周知の冷アルコール沈澱によって調製)に存在するヒアルロニダーゼの量の30倍を産生する(表1)。比較として、Cos-7細胞の一過性h p H A s e発現ではHEK細胞で達成されるレベルの約10%が発現された。理論に支持されないが、アデノウイルスで形質転換されるホ乳類細胞が好ましい。

30

表1. 種々の調製物のh p H A s eレベル

酵素供給源	ヒアルロニダーゼ活性
ヒト血漿	3~6 rTRU/ml
組換え血漿H A s e条件付け培養液	150.0 rTRU/ml

40

ホ乳類発現系由来の組換えh p H A s eは、いくつかの基準を用いて調べたとき生化学的に精製された酵素と区別できない。免疫親和性精製組換えh p H A s eは生化学的に精製したh p H A s eと同じ分子量で移動する。免疫親和性精製組換えh p H A s eのアミノ

50

酸配列は、天然の血漿酵素と同じように加工されたN末端を有する (FRGPLLV) (配列番号: 9)。さらに、N末端の配列決定によって、組換え h p H A s e は我々の発現系で適切に処理されることが示唆された。組換え h p H A s e は、ゲルザイモグラフィーで調べたとき生化学的に精製した h p H A s e と同等の比活性を有する。組換え h p H A s e、生化学的精製 h p H A s e および “最純性” 市販精巢ヒアルロニダーゼ調製物の10Uサンプルは、高分子量 H A 100 μ g を10分間で解重合させることができる。さらに、組換え h p H A s e は生化学的に精製した h p H A s e と同じ洗剤相分配特性を示す。これは、本発現系が組換え h p H A s e の正確な翻訳後処理を促進することを示唆している。

実施例15: 動物モデルにおける h p H A s e の腫瘍成長抑制活性

組換え h p H A s e の腫瘍増殖抑制能力をHSC-3頭部頸部有棘細胞癌モデル (正所性腫瘍異種移植 (本来の器官 / 組織への移植腫瘍)) で調べた。簡単に記せば、N u / N u マウスの口腔床にマトリゲル (Matrigel) 中の 5×10^6 個の H S C - 3 ヒト有棘細胞癌細胞を正所性移植した。この細胞を7日間成長させた。その後、動物をランダムに2つのグループに分けた。

17E9 IgG2a抗体をNHSセファロースに結合させた免疫親和性カラムを用いて、CMVプロモーターの下、h y a l - 1 を過発現している H E K の条件付け培養液から組換え h p H A s e を調製した。溶出 h p H A s e をウシHDL複合体 (Sigma) 中に置換し、バイオビーズ (Biobeads) に対して透析した。h p H A s e を含まないHDL複合体担体を陰性コントロールとして用いた。この物質を容量100 μ l でマウスの腫瘍周囲 (原発性腫瘍部位から約10mm) に注射した。1回の注射につき約400rTRUの h p H A s e を投与した。注射を48時間毎に繰り返した。球形モデルを用いて腫瘍容積を3寸法で測定した。図10に示すように、h p H A s e の投与は腫瘍容積を顕著に減少させた。

実施例16: 動物モデルにおける h p H A s e をコードする D N A の発現による腫瘍成長抑制

腫瘍細胞における h p H A s e 発現の腫瘍成長に対する影響を、機能的な h p H A s e 遺伝子を癌株に導入することによって調べた。ここで h p H A s e をコードする配列は、誘発性プロモーターの制御下にある。適切なステロイド応答性プラスミドを含むホ乳類細胞のみが刺激ホルモン (ムリステロン) の注射に応答するので、ステロイド応答性発現プラスミド、エクジソン (ecdysone) をこの実験のために選んだ。したがって、この系により、腫瘍細胞内で h p H A s e をコードする遺伝子の特異的再活性化効果の調査およびインビボ効果の評価が可能となる。

HSC-3口腔有棘細胞癌細胞に、T75フラスコあたりリポフェクチン (Gibco) 60 μ l、9 μ g プラスミドをトランスフェクトした。このプラスミドは、エクジソンレセプタープラスミドを含むムリステロン誘発性遺伝子構築物であって、h p H A s e (誘発性ステロイドの制御下) 並びに G 4 1 8 S およびゼオシン (zeocin) 耐性をコードするムリステロン誘発性遺伝子構築物 (エクジソン系、Invitogen) を有する。h p H A s e をコードする D N A を含まないムリステロン誘発性構築物で形質転換した細胞をコントロールとして用いた。形質転換細胞を 5×10^6 細胞 / 注射で n u / n u マウスの口腔床に実施例15で述べたように注射した。7日間腫瘍を成長させた後、マウスの腹腔にムリステロン (5 mg) を72時間毎に注射して構築物の発現を誘発した。腫瘍容積は上記実施例15で述べたように測定した。さらに、悪液質に陥る時間 (動物の体重が発発重量より15%減少することにより規定) を測定した。生存%よりむしろ悪液質%を用いて Kaplan・メイヤー (Kaplan Meyer) 分析によって生存曲線を作成した。

図11に示すように、h p H A s e をコードする構築物で形質転換したHSC-3細胞を有するマウスは、コントロールマウスと比較して腫瘍成長が著しく減少した。さらに、h p H A s e 発現腫瘍細胞をもつ殆どのマウスは、39日間にわたって悪液質を進行させなかった。本発明をこれまで十分に説明してきたが、多くの変更および修飾が添付の請求の範囲を逸れることなく実施しえることは当業者には明白であろう。

配列表

(1) 一般情報:

10

20

30

40

50

- (i) 出願人：ザ・リージェント・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア
- (i i) 発明の名称：ヒト血漿ヒアルロニダーゼ
- (i i i) 配列の総数：10
- (i v) 郵便物の宛先：
- (A) 名宛人：Robbins, Berliner & Carson, LLP
- (B) 街：201 N. Figueroa Street, 5 floor
- (C) 市：ロサンゼルス
- (D) 州：カリフォルニア
- (E) 国：アメリカ合衆国
- (F) Z I P：90012-2628 10
- (v) コンピューター解読形式：
- (A) 媒体型：フロッピーディスク
- (B) コンピューター：I B M P C コンパチブル
- (C) 作動システム：P C - D O S / M S - D O S
- (D) ソフト：Patent In Release #1.0, バージョン#1.25
- (v i) 現在の出願状況：
- (A) 出願番号：
- (B) 出願日：
- (C) 分類：
- (v i i i) 代理人情報： 20
- (A) 氏名：Robert Berliner
- (B) 登録番号：20121
- (C) リファレンス/ドケット番号：5555-458C1-XPC
- (i x) 通信に関する情報：
- (A) 電話：213-977-1001
- (B) ファックス：213-977-1003
- (2) 配列番号 1 の情報：
- (i) 配列の性状：
- (A) 長さ：4 3 5 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸 30
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直線状
- (i i) 分子の型：タンパク質
- (x i) 配列の記載：配列番号：1

Met	Ala	Gly	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	10
		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	20
			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		30
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 Gly 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	10
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	20
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu				
	290	295	300	
His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu				
	305	310	315	320
Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile				
	325	330	335	
Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr				
	340	345	350	30
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	40
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			

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 21 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : ペプチド

(x i) 配列の記載 : 配列番号 2

Met Ala Gly His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu Asp Met

1

5

10

15

Ala Gln Gly

10

20

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 435 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : タンパク質

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 3

Met	Ala	Gly	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	Val	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	10
			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			20
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	30
					165					170				175		
Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Trp	Met	Ala	Gly	Thr	Leu	Gln	Leu	Gly	Gly	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			40
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
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu	
290	295
His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu	
305	310
Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile	
	325
Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr	
	340
Ser Gly Ala Leu Leu Cys Ser Gln Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg	
	355
Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu Leu Asn Pro	
	370
Ala Ser Phe Ser Ile Gln Leu Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Ser Leu	
385	390
Arg Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Gln Ala Gln Met Ala Val Glu Phe	
	405
Lys Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Gln Ala Pro Trp Cys Glu Arg Lys	
	420
Ser Met Trp	
	435

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 2 5 1 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : c D N A

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 4

10

20

30

40

TTCCTCCAGG	AGTCTCTGGT	GCAGCTGGGG	TGGAATCTGG	CCAGGCCCTG	CTTAGGCCCC	60	
CATCCTGGGG	TCAGGAAATT	TGGAGGATAA	GGCCCTCAG	CCCCAAGGTC	AGCAGGGACG	120	
AGCGGGCAGA	CTGGCGGGTG	TACAGGAGGG	CTGGGTTGAC	CTGTCCTTGG	TACTGAGGC	180	
CATTGGATCT	TCCTCCAGTG	GCTGCCAGGA	TTTCTGGTGG	AAGAGACAGG	AAGGCCTCCC	240	
CCCCTTGGTC	GGGTCAGCCT	GGGGGCTGAG	GGCCTGGCTG	TCAGCCACTC	TTCCCAGAAC	300	
ATATGTCATG	GCCTCAGTGG	CTCATGGGGA	AGCAGGGGTG	GGCGAGCTTA	GGCTAGAGCA	360	
AGTCCTGTGG	GAGATGGCAG	AGGCCTGGTC	TGAGAGGCAA	CTCGGATGTG	CCCTCCAGTG	420	10
GCCATGCTCC	CCTCCATGCG	TCTCCCCTGC	CCTCCTGGAG	CCCTGCAGGT	CAATGTTTAA	480	
CAGAAACCAG	AGCAGCGGTG	GATTAATGCG	CAAGGGCTCA	GCCCCCAGC	CCTGAGCAGT	540	
GGGGGAATCG	GAGACTTTGC	AACCTGTTCT	CAGCTCTGCC	TCCCCTGGGC	AGGTTGTCCT	600	
CGACCAGTCC	CGTGCCATGG	CAGGCCACCT	GCTTCCCATC	TGCGCCCTCT	TCCTGACCTT	660	
ACTCGATATG	GCCCAAGGCT	TTAGGGGCC	CTTGGTACCC	AACCGGCCCT	TCACCACCGT	720	
CTGGAATGCA	AACACCCAGT	GGTGCCTGGA	GAGGCACGGT	GTGGACGTGG	ATGTCAGTGT	780	
CTTCGATGTG	GTAGCCAACC	CAGGGCAGAC	CTTCCGCGGC	CCTGACATGA	CAATTTTCTA	840	20
TAGTCCCAG	CTGGGCACCT	ACCCCTACTA	CACGCCCACT	GGGGAGCCTG	TGTTTGGTGG	900	
TCTGCCCCAG	AATGCCAGCC	TGATTGCCCA	CCTGGCCCGC	ACATTCCAGG	ACATCCTGGC	960	
TGCCATACCT	GCTCCTGACT	TCTCAGGGCT	GGCAGTCATC	GACTGGGAGG	CATGGCGCCC	1020	
ACGCTGGGCC	TTCAACTGGG	ACACCAAGGA	CATTTACCGG	CAGCGCTCAC	GGGCACTGGT	1080	
ACAGGCACAG	CACCCTGATT	GGCCAGCTCC	TCAGGTGGAG	GCAGTAGCCC	AGGACCAGTT	1140	
CCAGGGAGCT	GCACGGGCCT	GGATGGCAGG	CACCCTCCAG	CTGGGGGGGG	CACTGCGTCC	1200	
TCGCGGCCTC	TGGGGCTTCT	ATGGCTTCCC	TGACTGCTAC	AACTATGACT	TTCTAAGCCC	1260	30
CAACTACACC	GGCCAGTGCC	CATCAGGCAT	CCGTGCCCAA	AATGACCAGC	TAGGGTGGCT	1320	
GTGGGGCCAG	AGCCGTGCCC	TCTATCCCAG	CATCTACATG	CCCGCAGTGC	TGGAGGGCAC	1380	
AGGGAAGTCA	CAGATGTATG	TGCAACACCG	TGTGGCCGAG	GCATTCCGTG	TGGCTGTGGC	1440	
TGCTGGTGAC	CCCAATCTGC	CGGTGCTGCC	CTATGTCCAG	ATCTTCTATG	ACACGACAAA	1500	
CCACTTTCTG	CCCCTGGATG	AGCTGGAGCA	CAGCCTGGGG	GAGAGTGCGG	CCCAGGGGGC	1560	
AGCTGGAGTG	GTGCTCTGGG	TGAGCTGGGA	AAATACAAGA	ACCAAGGAAT	CATGTCAGGC	1620	
CATCAAGGAG	TATATGGACA	CTACACTGGG	GCCCTTCATC	CTGAACGTGA	CCAGTGGGGC	1680	40

CCTTCTCTGC AGTCAAGCCC TGTGCTCCGG CCATGGCCGC TGTGTCCGCC GCACCAGCCA 1740
 CCCCAAAGCC CTCCTCCTCC TTAACCCTGC CAGTTTCTCC ATCCAGCTCA CGCCTGGTGG 1800
 TGGCCCCCTG AGCCTGCGGG GTGCCCTCTC ACTTGAAGAT CAGGCACAGA TGGCTGTGGA 1860
 GTTCAAATGT CGATGCTACC CTGGCTGGCA GGCACCGTGG TGTGAGCGGA AGAGCATGTG 1920
 GTGATTGGCC ACACACTGAG TTGCACATAT TGAGAACCTA ATGCACTCTG GGTCTGGCCA 1980
 GGGCTTCCTC AAATACATGC ACAGTCATAC AAGTCATGGT CACAGTAAAG AGTACACTCA 2040
 GCCACTGTCA CAGGCATATT CCCTGCACAC ACATGCATAC TTACAGACTG GAATAGTGGC 2100 10
 ATAAGGAGTT AGAACCACAG CAGACACCAT TCATTCTCTGC TCCATATGCA TCTACTTGGC 2160
 AAGGTCATAG ACAATTCCTC CAGAGACACT GAGCCAGTCT TTGAACTGCA GCAATCACAA 2220
 AGGCTGACAT TCACTGAGTG CCTACTCTTT GCCAATCCCC GTGCTAAGCG TTTTATGTGG 2280
 ACTTATTCAT TCCTCACAAT GAGGCTATGA GGAAACTGAG TCACTCACAT TGAGAGTAAG 2340
 CACGTTGCCC AAGGTTGCAC AGCAAGAAAA GGGAGAAGTT GAGATTCAAA CCCAGGCTGT 2400
 CTAGCTCCGG GGTACAGCC CTTGCACTCC TACTGAGTTT GTGGTAACCA GCCCTGCACG 2460
 ACCCCTGAAT CTGCTGAGAG GCACCAGTCC AGCAAATAAA GCAGTCATGA TTTACTT 2517 20

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 2 0 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : c D N A

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 5

CAGGTTGTCC TGCACCAGTC 20

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 2 1 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : c D N A

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 6

ATGTGCAACT CAGTGTGTGG C 21

(2) 配列番号 7 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直線状

(i i) 分子の型 : c D N A

(x i) 配列の記載 : 配列番号 : 7

GTGCCATGGC AGGCCACC 18

(2) 配列番号 8 の情報 :

(i) 配列の性状 :

(A) 長さ : 2 0 塩基対

50

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		10
145	150	155
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		20
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
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser		30
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		40
305	310	315
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

10

20

30

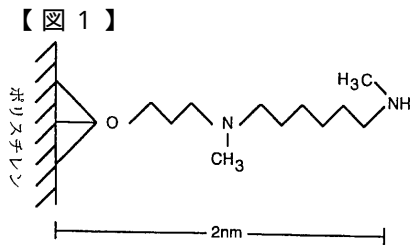


FIG. 1

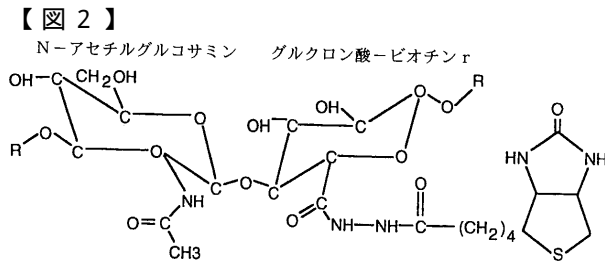


FIG. 2

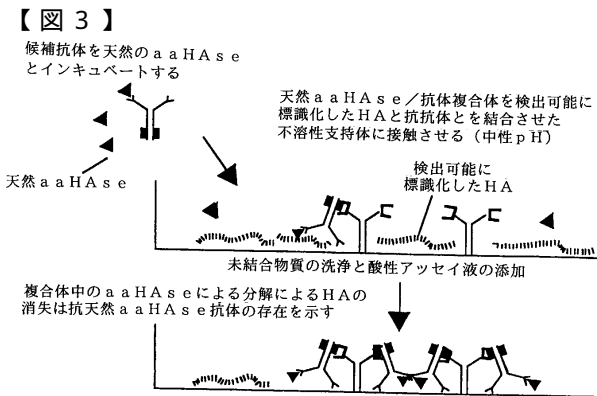


FIG. 3

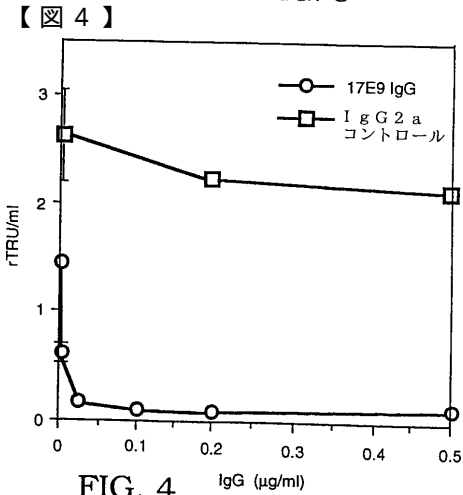


FIG. 4

【図5】

luca-1 MA GH LLFICALFL LLDMAOQERG PLVP 28
 ph20 MCVLKFKKHF FRSFVKSE GV SQIVFTFLI PCCLTLNERA PPVI 45

luca-1 NRPTVVWNA NTQWCIERHG VDVYVVFVY VANFGOTFRG PDMFT 73
 ph20 NVALWAWNA PSEFCIGKFD EPLDMLFSE IGSFRINATG QGVPT 90

luca-1 FYSSELEGTYP YVTP TGEPI FGLFQNASL IAHARTFQD ILAAI 117
 ph20 EYVDRLGYYR YIDSITGVIV NGCIPKISL QPHDKAKKD ITTFYM 135

luca-1 PAPDFSCLAY IDWEAWRPRW AFNWDTKDIY RQSKRA LVQA QHPDW 162
 ph20 FVDNL GMAY IDWEEWRPTW AFNWKPKDYY KNBSIE LVQQ QNVQL 179

luca-1 PAPOVEAVQ DQFQGAARAW MACLQLGGA LRRGLWGFY GFDPC 207
 ph20 SLTEATEKAK QEFKAGKDF LVEHKLGLK LRENHLWGY LFPDC 224

luca-1 YNYDFLSFNY TQCPSGIRA QNDLGLWNG QRALYPSIY MPAVL 252
 ph20 YNHYYKPKCY NGSCFNVEIK RNDLSLWLN ESTALYPSIY LNTQ 268

luca-1 EGTGK5QMYY QHRVAEAFRY A.VAAGDPNL RYLVYQIFY DITN 295
 ph20 QSPVAATLYV RNRVREARV SKIPDAKSP LRVAFATRIYV TDVVL 313

luca-1 HFLPLDEIEH SLGESAQCA AGVLWVSW NTRTKESCQA IKEYM 340
 ph20 KFLSQDELYV TFGETVAGS GIVIWGTLI IMRS MKSCLL LDNYM 358

luca-1 DTTCDFILN VTS GALLCSQ ALCSGHRCY RRTSHPKAL LNP 385
 ph20 EFNRYIN VTLAKMCSQ VLCQEQVCV RKNWNSDY LHLNP 403

luca-1 SFSLOLTPGG GPLSLRGALS LEDQAQMAVE FKRCYPGWQ APWCE 430
 ph20 NFAOLEK.G GKFTVRGKPT LEDLEQFSEK FYCSYSTLS CK...E 445

luca-1 RKSMMW..... DVCIADGCVI DAFKPPMET EEPQIFYNAS PSTLS 455
 ph20 KADYKDTDAV DVCIADGCVI DAFKPPMET EEPQIFYNAS PSTLS 490

luca-1 435 (配列番号: 3)

ph20 ATMFIVSILF LLISSVASL509 (配列番号: 11)

FIG. 5

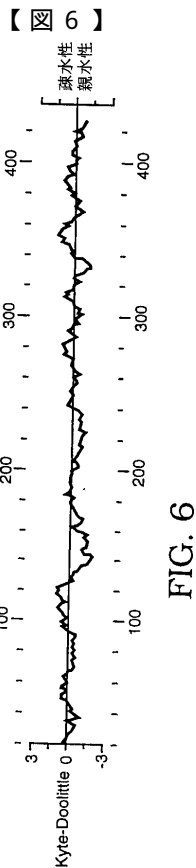


FIG. 6

【図7A】

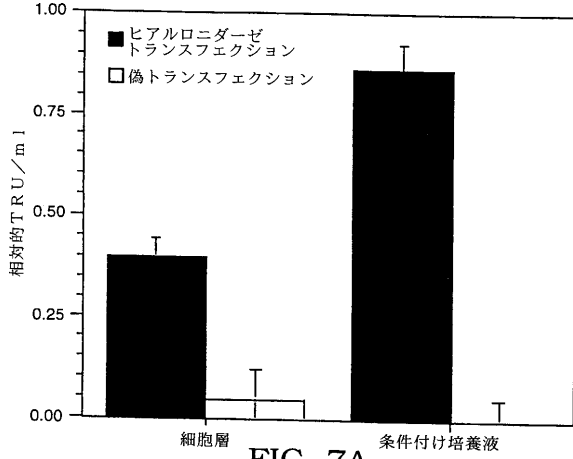


FIG. 7A

【図7B】

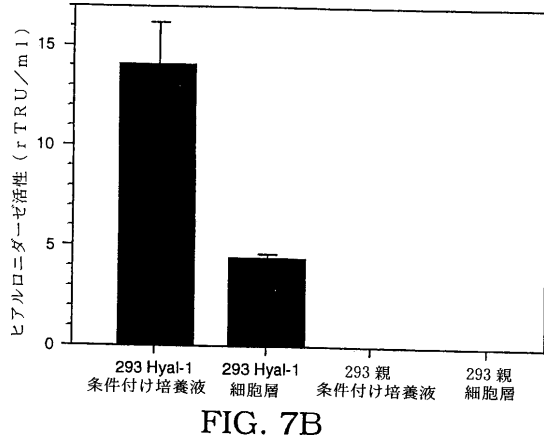


FIG. 7B

【図8】

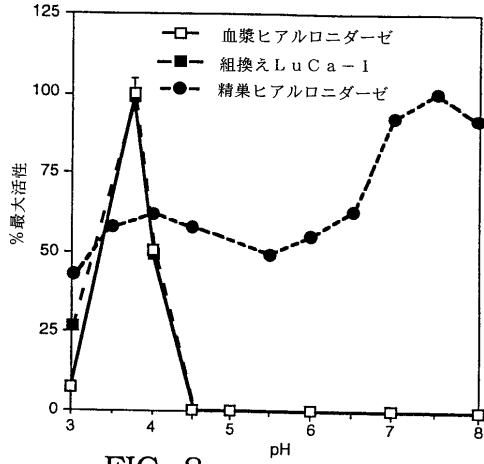


FIG. 8

【図10】

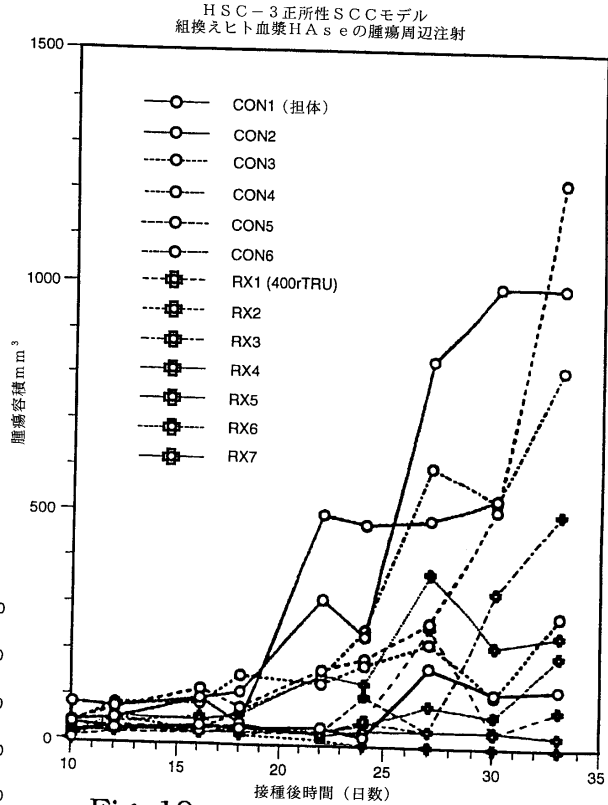


Fig. 10

【図9】

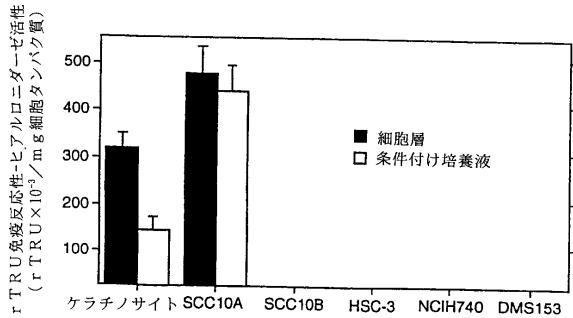
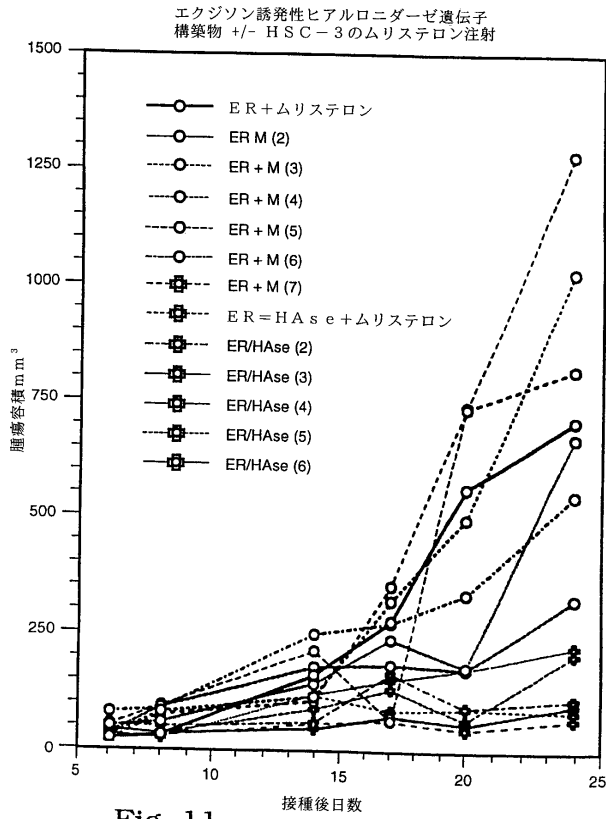
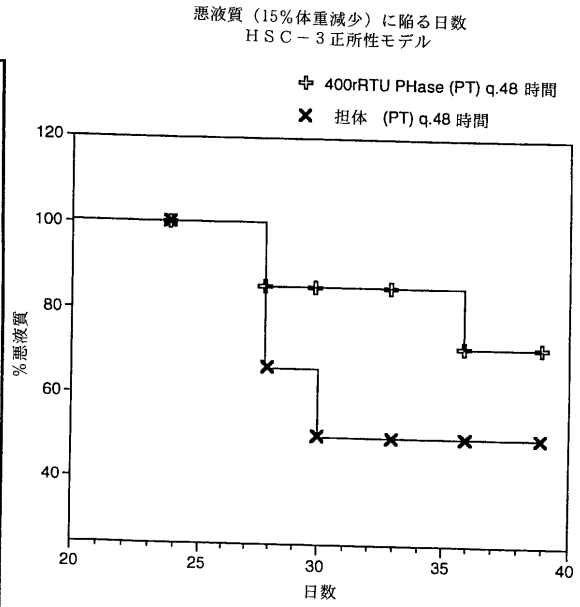


FIG. 9

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/40 (2006.01) C 0 7 K 16/40
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

微生物の受託番号 ATCC HB-12214

- (72)発明者 スターン、ロバート
 アメリカ合衆国 9 4 1 1 7 カリフォルニア州 サンフランシスコ ベルヴェディア ストリート 5 9 8
- (72)発明者 フロスト、グレゴリー、アイ.
 アメリカ合衆国 9 4 1 2 3 カリフォルニア州 サンフランシスコ フィルモア ストリート 3 5 7 5
- (72)発明者 ソカ、アンソニー
 アメリカ合衆国 9 4 1 1 7 カリフォルニア州 サンフランシスコ ベルヴェディア ストリート 5 9 8
- (72)発明者 ウォン、ティム、エム.
 アメリカ合衆国 9 4 1 1 6 カリフォルニア州 サンフランシスコ ワウオナ ストリート 2 3 4 0

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特開平08-269099(JP,A)
 Arch. Biochem. Biophys., (1993), 305, [2], p.434-441
 Cancer Res., (1996.04), 56, [7], p.1487-1492
 横田崇/新井賢一編, 「実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法」,
 株式会社羊土社, (1994), p.16

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
 C07K 16/40
 C12P 21/08
 C12N 5/10
 C12N 9/26
 PubMed