

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4464395号
(P4464395)

(45) 発行日 平成22年5月19日 (2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年2月26日 (2010.2.26)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/26 Z
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 38 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-509139 (P2006-509139)	(73) 特許権者	505333861
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		ヘイローザイム インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2006-524507 (P2006-524507A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(43) 公表日	平成18年11月2日 (2006.11.2)		ディエゴ エス17 ソレント バレー
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/006656		ロード 11588
(87) 国際公開番号	W02004/078140	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成19年3月5日 (2007.3.5)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/452, 360		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成15年3月5日 (2003.3.5)	(72) 発明者	ブックバインダー ルイ エイチ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
早期審査対象出願			ディエゴ ゲイブル リッジ ロード
			14823

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、その調製プロセス、使用およびそれを含む薬学的組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドのアスパラギン (N) 残基に共有結合された少なくとも一つの糖部分を含む実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチドであって、

該ヒアルロニダーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 1に記載のポリペプチドと比較してそのC末端が切断されており、かつ可溶性であり、

該ヒアルロニダーゼポリペプチドが中性活性であり、

該ヒアルロニダーゼポリペプチドが

SEQ ID NO: 1のアミノ酸1-477、1-478、1-479、1-480、1-481、1-482、又は1-483に記載のアミノ酸配列をコードする、または、

SEQ ID NO: 1のアミノ酸1-477、1-478、1-479、1-480、1-481、1-482、又は1-483に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸置換を含むアミノ酸配列をコードし、該コードされたアミノ酸置換のポリペプチドがSEQ ID NO: 1のアミノ酸1-477、1-478、1-479、1-480、1-481、1-482、又は1-483に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%アミノ酸配列同一性を有する、前記アミノ酸配列をコードする、

ヌクレオチド配列によってコードされる、

前記実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項2】

可溶性で、中性活性であり、かつ

SEQ ID NO: 1のアミノ酸36-482またはSEQ ID NO: 1のアミノ酸1-482をコードする核酸

分子によってコードされる、
ポリペプチドのアスパラギン(N)残基に共有結合された少なくとも一つの糖部分を含む実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項3】

核酸分子がSEQ ID NO: 48に記載のヌクレオチドの配列からなる、請求項2に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項4】

シグナル配列を含まず、SEQ ID NO: 1のアミノ酸1-477、1-478、1-479、1-480、1-481、1-482、又は1-483に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列による発現と分泌により産生される実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

10

【請求項5】

CHO細胞において発現されかつ分泌された、請求項4に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項6】

SEQ ID NO: 1のアミノ酸36-482に記載のアミノ酸の配列からなる、請求項2に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項7】

アミノ酸36-483の配列からなる、請求項4に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項8】

20

ポリマーで修飾される、請求項1または2に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項9】

ポリマーがPEGまたはデキストランである、請求項8記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項10】

核酸が、ヒトPH20のカルボキシ末端のアミノ酸をコードする核酸領域を欠く、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項11】

SEQ ID NO: 48に記載のヌクレオチドの配列からなる、請求項10記載の核酸分子。

30

【請求項12】

請求項10記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項13】

SEQ ID NO: 51に記載のヌクレオチドの配列を含む、請求項12記載のベクター。

【請求項14】

発現ベクターである、請求項12または13記載のベクター。

【請求項15】

真核細胞ベクターである、請求項12または13において主張するベクター。

【請求項16】

Pichiaベクター、E. coliベクター、またはウイルスベクターである、請求項12-15のいずれか一項記載のベクター。

40

【請求項17】

請求項12または13記載のベクターを含む単離された細胞。

【請求項18】

原核細胞である、請求項17記載の細胞。

【請求項19】

真核細胞である、請求項17記載の細胞。

【請求項20】

細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、または動物細胞から選択される、請求項17記載の細胞。

50

【請求項 2 1】

哺乳類細胞である、請求項17記載の細胞。

【請求項 2 2】

以下の段階を含む、請求項1記載のヒアルロニダーゼポリペプチドを製造するための方法：

適当なプロモーターに作動可能に連結された請求項1記載のポリペプチドをコードする核酸を、ポリペプチド中にN-結合糖部分を組み込むことができる細胞に導入する段階；

コードされたポリペプチドが該細胞により発現される条件下で該細胞を培養する段階；
および

該発現されたポリペプチドを回収する段階。

10

【請求項 2 3】

細胞が真核細胞である、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

真核細胞が、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または植物細胞から選択される、請求項23記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞がCHO細胞である、請求項24記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項1または2に記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチドを薬学的に活性な成分として含む薬学的組成物。

20

【請求項 2 7】

ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1のアミノ酸1-482をコードする核酸分子の哺乳類細胞における発現によって産生される、請求項4記載の実質的に精製されたヒアルロニダーゼポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項 2 8】

哺乳類細胞がCHO細胞である、請求項27記載の薬学的組成物。

【請求項 2 9】

追加の薬学的に活性な薬剤をさらに含む、請求項26または27記載の薬学的組成物。

【請求項 3 0】

追加の薬学的に活性な薬剤が、化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、抗菌薬、抗アメーバ薬、抗トリコモナス薬、抗パーキンソン薬、抗マラリア薬、抗けいれん薬、抗うつ薬、および抗関節炎薬、抗真菌薬、血圧降下薬、解熱薬、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン薬、 α -アドレナリン作動薬、遮断薬、麻酔薬、気管支拡張薬、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、 α -アドレナリン遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、心臓脈管薬、避妊薬、鬱血除去薬、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質剤、催眠薬、ホルモン薬、血糖上昇薬、筋弛緩薬、筋収縮薬、眼薬、副交感神経興奮薬、精神賦活薬、鎮静薬、交感神経様作用薬、精神安定薬、尿管薬、殺ウイルス剤、ビタミン薬、非ステロイド性抗炎症薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、ポリペプチド、タンパク質、核酸、薬物、有機分子、および入眠薬の中から選択される、請求項29記載の薬学的組成物。

30

【請求項 3 1】

化学療法薬が毒素または腫瘍壊死因子である、請求項30記載の薬学的組成物。

40

【請求項 3 2】

麻酔薬がリドカインまたはブピバカインである、請求項30記載の薬学的組成物。

【請求項 3 3】

ホルモン剤をさらに含む、請求項30記載の薬学的組成物。

【請求項 3 4】

ホルモン剤がエピネフリンである、請求項33記載の薬学的組成物。

【請求項 3 5】

追加の薬学的に活性な薬剤が、インスリン、サイトカイン、抗体、およびモノクローナル抗体の中から選択される、請求項29記載の薬学的組成物。

50

【請求項36】

請求項1、2、または4のヒアルロニダーゼポリペプチドを含む、抱合体。

【請求項37】

過剰なグリコサミノグリカンを処置する際の使用のため；腫瘍を処置するため；心臓疾患を処置するため；固形腫瘍への化学療法薬の透過を増加させるため；硝子体液の液化を誘導する際の使用のため；または、過剰な量のグリコサミノグリカンを含む組織にサイズが500nm未満の分子を送達する際の使用のための、請求項26-35のいずれか一項記載の組成物。

【請求項38】

過剰なグリコサミノグリカンを処置する際の使用のため；心臓疾患を処置するため；固形腫瘍への化学療法薬の透過を増加させるため；硝子体液の液化を誘導する際の使用のため；または、過剰な量のグリコサミノグリカンを含む組織にサイズが500nm未満の分子を送達する際の使用のための、薬剤の製造の際の請求項26-35のいずれか一項記載の組成物の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は全体として、中性活性の可溶性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、その一部分、特にヒアルロニダーゼドメインに関する。より具体的には、本発明は、化学修飾、薬学的組成物、発現プラスミド、製造方法、および疾患の治療において、グリコサミノグリカンの治療的修飾のために、および直径が200ナノメートル未満の他の注入分子の動物内での拡散の増大用に、ヒアルロニダーゼ糖タンパク質およびそのドメインならびにそのコード化核酸分子を用いる治療方法に関する。なお、本出願は、2003年3月5日付で出願された米国特許出願第60/452,360号の米国特許法第119条(e)項に基づく優先権を主張するものであり、その出願はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0002】

背景情報

グリコサミノグリカン(GAG)は、細胞外マトリクス(ECM)の複合型の直鎖状多糖類である。GAGは、N置換ヘキソサミンとウロン酸、[ヒアルロナン(HA)、コンドロイチン硫酸(CS)、コンドロイチン(C)、デルマトン硫酸(DS)、ヘパラン硫酸(HS)、ヘパリン(H)]またはガラクトース、[ケラタン硫酸(KS)]との二糖類構造の繰り返しにより特徴付けられる。HAを除き、全てコアタンパク質に共有結合して存在する。そのコアタンパク質を有するGAGは、構造的にプロテオグリカン(PG)といわれる。

30

【0003】

ヒアルロナン(HA)は、哺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、それによって細胞運動および細胞増殖に役立つ環境を作り出す。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

40

(Toole 1991

Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand et al. 1992 Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson et al, 1993 FASEB J. 7:1233-1241). さらに、

ヒアルロナンレベルは、腫瘍の悪性度(aggressiveness)と関連している。

(Ozello et al. 1960 Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi et al. 1976, Cancer Res.

36:2133-2139; Kimata et al. 1983 Cancer Res. 43:1347-1354)

10

【 0 0 0 4 】

HAは、多くの細胞の細胞外マトリクスで、特に軟結合組織で見出される。HAには、水中および血漿中のタンパク質恒常性のような、さまざまな生理学的機能が特定されている(Laurent TC et al (1992) FASEB J 6: 2397-2404)。HAの産生は増殖中の細胞で増加し、有糸分裂に参与し得る。これはまた、移動運動および細胞遊走に参与するとされている。HAは、細胞の調節、発生、および分化で重要な役割を果たすようである(Laurent et al、前掲)。

【 0 0 0 5 】

HAは臨床医学で使用されてきた。その組織保護およびレオロジー特性は、白内障の手術の間に角膜内皮を保護するための眼科手術に有用なことが分かっている。血清HAは、肝疾患および関節リウマチのような、さまざまな炎症状態の診断になる。HAの蓄積により引き起こされる間質浮腫は、さまざまな器官で機能不全を引き起こし得る(Laurent et al、前掲)。

20

【 0 0 0 6 】

ヒアルロナンタンパク質の相互作用は同様に、細胞外マトリクスまたは「細胞間質」の構造にも関連している。

【 0 0 0 7 】

ヒアルロニダーゼは、動物界全体で見出される一群の中性活性および酸活性の酵素である。ヒアルロニダーゼは、基質特異性、および作用機序に関してさまざまである。

【 0 0 0 8 】

三つの一般的区分のヒアルロニダーゼが存在する：

30

【 0 0 0 9 】

1. 哺乳類型ヒアルロニダーゼ(EC3.2.1.35)は主要な最終生成物を四糖と六糖とするエンド-β-N-アセチルヘキソサミニダーゼである。それらは加水分解活性と糖転移活性の両方を持ち、ヒアルロナンとコンドロイチン硫酸(CS)、特にC4-SとC6-Sを分解することができる。

【 0 0 1 0 】

2. 細菌性ヒアルロニダーゼ(EC4.2.99.1)はヒアルロナンと、いろいろな程度でCSとDSを分解する。それらはエンド-β-N-アセチルヘキソサミニダーゼで主に二糖を最終生成物とする エリミネーション反応によって作用する。

40

【 0 0 1 1 】

3. ヒル、その他の寄生虫や甲殻類のヒアルロニダーゼ(EC3.2.1.36)はエンド-β-グルクロニダーゼで、β-1-3結合の加水分解により最終生成物の四糖と六糖を生じる。

【 0 0 1 2 】

哺乳類ヒアルロニダーゼは、二つの群、つまり中性活性および酸性活性の酵素にさらに分類することができる。ヒトのゲノムには6種のヒアルロニダーゼ様遺伝子、

HYAL1, HYAL2, HYAL3 HYAL4 HYALP1およびPH20/SPAM1

が存在する。HYALP1は偽遺伝子であり、HYAL3は任意の既知の基質に対して酵素活性を有することが示されていない。HYAL4はコンドロイチナーゼであり、ヒアルロナンに対する

50

活性がない。HYAL1は原型的な酸性活性酵素であり、PH20は原型的な中性活性酵素である。HYAL1およびHYAL2のような、酸性活性ヒアルロニダーゼは中性pHで触媒活性がない。例えば、HYAL1はインビトロでpH4.5を超えると触媒活性がない(Frost et al Anal Biochemistry, 1997)。HYAL2はインビトロの特異活性が非常に低い酸性活性酵素である。

【 0 0 1 3 】

ヒアルロニダーゼ様酵素は同様に、ヒトHYAL2およびヒトPH20のようなグリコシルホスファチジルイノシトール・アンカーを介して原形質膜に結合されるもの(Danilkovitch-Miagkova, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Apr 15;100(8):4580-5, Phelps et al., Science 1988)およびヒトHYAL1のように可溶性であるもの(Frost et al, Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 9;236(1):10-5)により特徴付けることができる。しかしながら、種間でばらつきがある：例えば、ウシPH20は原形質膜に非常に緩く付着されており、ホスホリパーゼ感受性アンカーを介して結合されていない(Lancette et al, Biol Reprod. 2001 Aug;65(2):628-36.)。ウシヒアルロニダーゼのこの独特な特徴が、臨床用途のための抽出物(Wydase(登録商標)、Hyalase(登録商標))としての可溶性ウシ精巢ヒアルロニダーゼ酵素の使用を可能にしている。他のPH20種は、界面活性剤(detergent)またはリパーゼの使用なしでは不溶性にならない脂質結合酵素である。例えば、ヒトPH20はGPIアンカーを介して原形質膜に結合される。ポリペプチドに脂質アンカーを導入できないヒトPH20 DNA構築物を作製しようとする試みの結果、触媒的に不活性な酵素、または不溶性酵素が得られた(Arming et al Eur J Biochem. 1997 Aug 1;247(3): 810-4)。天然に存在するマカクザル精子ヒアルロニダーゼは、可溶型と膜結合型の両方が見出されている。64kDaの膜結合型はpH7.0で酵素活性を有するが、54kDa型はpH4.0でのみ活性である(Cherr et al, Dev Biol. 1996 Apr 10;175(1):142-53.)。したがって、可溶型のPH20は中性条件の下では酵素活性を欠いていることが多い。

【 0 0 1 4 】

コンドロイチナーゼは、動物界全体で見出される酵素である。これらの酵素は、エンドグリコシダーゼ反応によりグリコサミノグリカンを分解する。既知のコンドロイチナーゼの具体例には、コンドロイチナーゼABC (プロテウス・ブルガリス(*Proteus vulgaris*)由来; Japanese Patent Application Laid-open No 6-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai, and T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243, 1543 (1968))、コンドロイチナーゼAC (フラボバクテリウム・ヘパリナム(*Flavobacterium heparinum*)由来; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968))、コンドロイチナーゼAC II (アルスロバクター・アウレセンス(*Arthrobacter aureus*)由来; K. Hiyama, and S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama and S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201 (1976))、ヒアルロニダーゼAC III (フラボバクテリウム種(*Flavobacterium* sp.) Hp102由来; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989))、コンドロイチナーゼB (フラボバクテリウム・ヘパリナム(*Flavobacterium heparinum*)由来; Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akiko Ueno, and Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985))、コンドロイチナーゼC (フラボバクテリウム種(*Flavobacterium* sp.) Hp102由来; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989))、および同様のものが含まれる。

【 0 0 1 5 】

糖タンパク質は、一つまたは複数の糖質部分が共有結合したポリペプチド鎖からなる。N-グリコシド結合またはO-グリコシド結合によりその構成タンパク質に結合した糖質を有する糖タンパク質からなる二つの広義のカテゴリーがある。N-およびO-結合グリカンは、それぞれアスパラギン-N-アセチル-D-グルコサミン結合およびセリン(スレオニン)-N-ア

10

20

30

40

50

セチル-D-ガラクトサミン結合によりポリペプチドに付着する。複合型N-結合オリゴ糖は末端マンノース残基を含んでいない。それらは末端N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、および/またはシアル酸残基のみを含む。ハイブリッドオリゴ糖は末端マンノース残基ならびに末端N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、および/またはシアル酸残基を含む。

【0016】

N-結合糖タンパク質で、オリゴ糖前駆体は、小胞体でのペプチド合成の間にアスパラギンのアミノ基に付着する。オリゴ糖部分はその後、糖部分を取り除きかつ付加する一連の特異酵素により逐次的にプロセッシングされる。プロセッシングは小胞体で起こり、シス-、メディアル-およびトランス-ゴルジ装置の通過とともに継続して起こる。

10

【発明の開示】

【0017】

発明の概要

本明細書で提供されるのは、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質ファミリーのメンバー、特にヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(本明細書ではsHASEGPとも呼ぶ)である。本明細書で提供されるsHASEGPは、sHASEGPファミリーのメンバーであり、本明細書ではsHASEGPと表される。可溶性ヒアルロニダーゼドメイン、およびその使用が同様に提供される。

【0018】

本発明は、ヒトPH20 cDNAのカルボキシ末端のアミノ酸をコードする狭い領域を欠く核酸を導入することにより、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ活性を哺乳類発現系に高い収量でもたらすことができるという発見に基づいている。分泌を促進させるための外来性リーダーペプチドの使用によるsHASEGPのさらなる修飾も提供される。sHASEGPの半減期を引き延ばすため、そのタンパク質をポリエチレングリコールでマスクすることおよび先天的グリコシル化に対する翻訳後修飾によりsHASEGPを修飾するための方法がさらに提供される。中性活性ヒトsHASEGPを分泌させようという以前の試みは失敗だった。ヒトsHASEGPポリペプチドの切断は、中性の酵素活性の喪失、および哺乳類発現系における細胞の組換えタンパク質分泌能力の低下の両方を引き起こすと結論付けられた(Arming, et al Eur J Biochem 1997 Aug 1;247 (3):810-4)。ヒアルロニダーゼとしての商業生産および治療有用性には、中性で作用する分泌sHASEGPを生み出すことが極めて重要である。本明細書で

20

30

【0019】

本発明は、触媒的に活性なヒトsHASEGP糖タンパク質であって、少なくとも一つのN-結合糖部分を有するsHASEGPをさらに含む。本明細書に示される研究により、ヒトPH20は触媒活性にN-結合グリカンが必要とするが、ウシおよびハチ毒ヒアルロニダーゼはそのようなN-結合グリカンなしでも活性のままであることが実証される。N-結合部分を欠いているヒトヒアルロニダーゼドメインは触媒的に不活性である。したがって、古典的組換えDNA技術では、大腸菌で産生可能なハチ毒HASEGPとは異なり、触媒的に活性なヒトsHASEGPの産生が可能とされない。

【0020】

本発明は、N-結合糖部分を導入できる細胞の使用によるまたはsHASEGPポリペプチドへのN-結合部分の導入による、N-結合sHASEGP糖タンパク質ポリペプチドの産生のための方法および細胞を含む。適切にグリコシル化されたsHASEGPの同定方法がさらに開示される。

40

【0021】

触媒的に活性な過シアル化(super-sialated)sHASEGP糖タンパク質が同様に提供される。過シアル化sHASEGPは、天然に存在するシアル化されていないウシおよびヒツジ精巢sHASEGPと比べて大きな血中半減期を有し、したがって、酵素安定性および静注薬物としての使用の両方で好ましい。本発明は過シアル化sHASEGPの調製方法、その組成物および使用を提供する。

50

【0022】

天然のGPIアンカーが欠損したsHASEGPのspray変異体によりコードされるタンパク質が同様に提供される。

【0023】

さらに提供されるのは、金属イオンを有する可溶性sHASEGP糖タンパク質を含むsHASEGPの組成物であり、その際に金属イオンはカルシウム、マグネシウムまたはナトリウムである。sHASEGPは前記の金属の存在下では至適に活性である。前記の金属イオンの存在下のsHASEGPからなる製剤が同様に提供される。

【0024】

半減期をさらに引き延ばすためのsHASEGPの修飾が提供される。ポリエチレングリコールおよびデキストランのようなポリマーによるsHASEGPの化学修飾が提供される。そのような修飾は、sHASEGPタンパク質を循環系および免疫系ならびにマンノースおよびアシアロ糖タンパク質に対するグリコシル化受容体からの除去から守る。グリコシル化部位、正荷電アミノ酸およびシステインのような特異的官能基に結合させるための方法がさらに提供される。

10

【0025】

sHASEGPの活性化、発現または活性を調節する、小分子を含む化合物のようなエフェクター、ならびにpH、温度およびイオン強度のような条件を同定するためのアッセイが同様に本明細書で提供される。典型的なアッセイでは、既知の基質、通常、グリコサミノグリカンまたはプロテオグリカンを切断するsHASEGPのヒアルロニダーゼドメインの能力に対する試験化合物の効果が評価される。ヒアルロニダーゼドメインの活性を調節する、作用物質、一般的に化合物、特に小分子がsHASEGPの活性を調節するための候補化合物である。ヒアルロニダーゼドメインは同様に、機能攪乱活性を有するヒアルロニダーゼ特異的抗体を産生させるのに使用することができる。本明細書で提供されるヒアルロニダーゼドメインは、インビトロで触媒活性を示すそのC末端切断部分を有するN-末端グリコシル-ヒドロラーゼドメインを含むがこれに限定されることはない。

20

【0026】

そのタンパク質およびヒアルロニダーゼドメインをコードする核酸分子が同様に提供される。可溶性ヒアルロニダーゼドメインまたは触媒的に活性なその一部分をコードする核酸分子および同様に完全長のsHASEGPをコードする核酸分子が提供される。ヒアルロニダーゼドメインをコードする核酸および下流の核酸はSEQ ID NO. 6に記載されており; およびsHASEGPのヒアルロニダーゼドメインはSEQ ID NO. 1に記載されている(アミノ酸35~44)。そのタンパク質配列および完全長のsHASEGPのコード化核酸配列は、SEQ ID NO. 1および6に記載されている。

30

【0027】

そのようなsHASEGPをコードする核酸にその完全長に沿ってまたは完全長の少なくとも約70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズし且つヒアルロニダーゼドメインおよびその一部分をコードする核酸分子が同様に提供される。ハイブリダイゼーションは一般に、少なくとも低度の、通常は少なくとも中等度の、およびたいがい高度のストリンジェンシー条件下で達成される。

40

【0028】

単離される核酸断片は、ゲノムもしくはcDNAを含むDNAであり、またはRNAであり、またはタンパク質核酸もしくは他のヌクレオチド類似体のような、他の成分を含むことができる。単離される核酸には、異種のまたは天然のプロモーター、ならびに他の転写および翻訳調節配列のような、さらなる構成要素が含まれてもよく、これらの遺伝子は、レポーター遺伝子もしくは他のインジケータ遺伝子またはインジケータをコードする遺伝子のような、他の遺伝子に連結されてもよい。

【0029】

同様に提供されるのは、sHASEGPまたはその一部分をコードするヌクレオチド配列に相補的である分子配列を含んだ単離核酸分子である。

50

【0030】

同様に提供されるのはその断片またはオリゴヌクレオチドであり、それらはプローブもしくはプライマーとして使用でき且つSEQ ID NO. 6 (またはその相補体)に記載される、少なくとも約10、14、16ヌクレオチド、通常、1000未満または100以下のヌクレオチドを含む; または少なくとも約30ヌクレオチド(またはその相補体)を含むまたはそのような断片もしくはオリゴヌクレオチドのいずれかにその完全長(または少なくともその約70、80もしくは90%)に沿ってハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。断片の長さは、それらを使用する目的および/または対象とするゲノムの複雑度に応じる。一般に、プローブおよびプライマーは約50、150または500未満のヌクレオチドを含む。

【0031】

同様に提供されるのは、本明細書で提供される核酸分子のいずれかを含有するプラスミドである。プラスミドを含有する細胞も提供される。そのような細胞は、以下に限定されることはないが、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞を含む。

【0032】

同様に提供されるのは、sHASEGPの効率的な分泌を可能とするシグナルリーダーを利用する機能強化された哺乳類発現系である。そのような効率的な分泌リーダーペプチドのアミノ酸配列およびsHASEGPとの融合タンパク質の一例はSEQ ID NO. 43および46で見られる。

【0033】

同様に提供されるのは、sHASEGPが細胞により発現される条件の下での上記の細胞の増殖、および発現したsHASEGPポリペプチドまたは糖タンパク質の回収によるsHASEGPの製造方法である。他のsHASEGPをコードする核酸を単離するための方法も提供される。

【0034】

同様に提供されるのは、sHASEGPポリペプチドが細胞の表面に発現される、細胞、通常、哺乳類細胞および酵母細胞のような真核細胞である。そのような細胞は、sHASEGPポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための薬物スクリーニングアッセイで使用される。これらのアッセイには、インビトロ結合アッセイ、およびプロ成長因子の活性化によるような、sHASEGPにより直接的にまたは間接的に媒介されるシグナル伝達を評価する、転写に基づくアッセイが含まれる。

【0035】

同様に提供されるのは、そのような核酸分子によりコードされるペプチドである。それらのポリペプチドのなかに含まれるのは、sHASEGPヒアルロニダーゼドメインまたはその特異性および/もしくはヒアルロニダーゼ活性が実質的に不変であるようなアミノ酸変化を有するポリペプチドである。具体的には、中性で触媒的に活性な分泌型のものを含む、実質的に精製された哺乳類sHASEGP糖タンパク質が提供される。

【0036】

本発明は同様に、ヒアルロニダーゼ触媒ドメインを含み、さらに他のドメインを含むことができる。sHASEGPはホモ二量体を形成することができ、同様に膜結合タンパク質のような、その他のタンパク質とヘテロ二量体を形成することができる。同様に提供されるのは、sHASEGPに対し少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸の配列を含む実質的に精製された糖タンパク質であり、その場合、パーセント同一性は、標準的なアルゴリズムおよびパーセント同一性を最大にするギャップペナルティーにより決定される。

【0037】

sHASEGPのスプライス変異体、特に触媒的に活性なヒアルロニダーゼドメインを有するものが本明細書で企図される。

【0038】

他の実施形態では、sHASEGPポリペプチドのヒアルロニダーゼドメインまたは触媒的に

10

20

30

40

50

活性なその一部分を含むが、SEQ ID NO. 1に記載されるアミノ酸の配列全体を含まない実質的に精製されたポリペプチドが提供される。これらのなかには、SEQ ID NO. 1または3に対し少なくとも70%、80%、85%、90%、95%または100%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドがある。

【0039】

特定の実施形態では、真核生物のヒアルロニダーゼ糖タンパク質をコードする核酸配列、つまり指定のsHASEGPが提供される。具体的には、その核酸は、SEQ ID NO. 6に記載される、とりわけSEQ ID NO. 6のヌクレオチド106~1446として記載されるヌクレオチドの配列、または触媒的に活性なポリペプチドをコードするその一部分を含む。

【0040】

同様に提供されるのは、SEQ ID NO. 6またはその縮重体に対して少なくとも低度のストリンジェンシー、通常は中等度のストリンジェンシー、より典型的には高度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子である。

【0041】

一つの実施形態では、単離される核酸断片は、SEQ ID NO: 6に記載されるヌクレオチド配列を含有する核酸分子(またはその縮重体)に対して高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。完全長のsHASEGPはSEQ ID NO.1に記載されており、SEQ ID NO. 6またはその縮重体によりコードされる。

【0042】

同様に提供されるのは、sHASEGPのヒアルロニダーゼドメインの突然変異タンパク質、特に結合していない(すなわち、ヒアルロニダーゼドメインの任意の他のCys残基とジスルフィド結合を形成しない)ヒアルロニダーゼドメインのCys残基が別のアミノ酸置換で、通常、必ずではないが、保存的アミノ酸置換または活性をなくさない置換で置換されている突然変異タンパク質、および特定のグリコシル化部位が除去されている突然変異タンパク質である。

【0043】

sHASEGPポリペプチド(以下に限定されることはないが、そのスプライス変異体、およびsHASEGPをコードする核酸、ならびにそのドメイン、誘導体および類似体を含む)が本明細書で提供される。sHASEGPを形成させるシグナルペプチダーゼの活性化により産生されるものに機能的に等価なN-末端を有する一本鎖の分泌ヒアルロニダーゼ糖タンパク質が同様に提供される。SEQ ID NO: 1に例示されるように、7箇所の潜在的N-結合グリコシル化部位がsHASEGPのN82、N166、N235、N254、N368、N393、N490に存在する。ジスルフィド結合がCys残基C60とC351との間およびCys残基C224とC238との間に生じて、ヒアルロニダーゼの中核ドメインを形成する。しかしながら、SEQ ID NO.1のアミノ酸36からCys 464までのsHASEGPに最低限に活性なヒトsHASEGPヒアルロニダーゼドメインが含まれるように、中性の酵素触媒活性には、カルボキシ末端にさらなるシステインが必要とされる。したがって、N-結合グリコシル化部位N-490は、適切なsHASEGP活性には必要とされない。

【0044】

sHASEGPのN-結合グリコシル化は、その触媒活性および安定性に極めて重要である。糖タンパク質を修飾するグリカンの種類を変化させることでタンパク質の抗原性、構造的折り畳み、溶解性、および安定性に劇的な影響を及ぼすことができるが、大部分の酵素は、至適な酵素活性にグリコシル化を必要とするとは考えられない。したがって、sHASEGPはこの点で特異であり、N-結合グリコシル化のその除去により、ヒアルロニダーゼ活性をほぼ完全に不活化させることができる。N-結合グリカンの存在は、活性なsHASEGPを産生させるのに極めて重要である。sHASEGPへの重要なN-結合グリコシル化残基の導入に適したタンパク質発現系が含まれる。さらに、N-結合グリカンを導入できる抽出物の存在下に、脱グリコシル化されたsHASEGPポリペプチドを導入することが含まれる。本発明の一つの側面では、シアル化でキャップされる複合型グリコシル化が記述されるが、遊離マンノース残基でキャップされる他のものも同様に企図される。シアル酸残基は、sHASEGPのN-結合グリコシル化の末端残基に見出されることが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

N-結合オリゴ糖はいくつかの主要型(オリゴマンノース型、複合型、ハイブリッド型、硫酸型)に分類され、これらの全てが-Asn-Xaa-Thr/Ser-配列(式中XaaはProではない)に含まれるAsn残基のアミド窒素を介して付着されるコアの(Man) 3-GlcNAc-GlcNAc-を有する。-Asn-Xaa-Cys-部位でのグリコシル化が凝固タンパク質Cで報告されている。N-結合部位は、配列決定の間の「ブランク」サイクルの出現により間接的に割り当てられることが多い。積極的な同定は、グリコシル化AsnをAspに変換するPNGase Fによるオリゴ糖の遊離後に行うことができる。PNGase Fによる遊離後、N-結合オリゴ糖をBio-Gel P-6クロマトグラフィーを用いて精製し、そのオリゴ糖のプールを分取用の高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8)にかけることができる。ある種のオリゴ糖異性体は、HPAECを用いて分離することができる。フコース残基はHPAECクロマトグラムで溶出位置を早くに移動させることになるが、付加的なシアル酸残基は保持時間を増大させることになる。オリゴ糖の構造が知られている糖タンパク質(例えば、ウシフェツイン、 α -1酸性糖タンパク質、オポアルブミン、RNase B、トランスフェリン)を同時に処理することで、オリゴ糖のピークの割り当てを容易にすることができる。回収されるオリゴ糖は、NMR分光法により割り当てられたアノマー配置(Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230)との、組成およびメチル化連鎖分析(Waeghe et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304.)の組み合わせにより特徴付けることができる。

10

【 0 0 4 6 】

sHASEGPの製剤が同様に提供される。sHASEGPは凍結乾燥形態および安定化溶液に製剤化されることができる。カルシウム、マグネシウム、またはナトリウムのような、特定の金属イオンを含有する製剤は、中性pHでの至適活性に有用である。安定化溶液の製剤に加えて、徐放性製剤がグリコサミノグリカンの長時間除去のために本明細書で企図される。同様に本明細書で提供されるのは、眼内外科処置のための少容量のsHASEGPの投与および他の少容量処置のためのsHASEGPが予め入った注射器を供与するキットである。人工生殖技術法でのエクスピボ用途のための平衡塩類製剤が同様に提供される。

20

【 0 0 4 7 】

グリコサミノグリカンの除去におけるsHASEGPタンパク質の使用方法が同様に提供される。sHASEGPはグリコサミノグリカンの分解を介して間質腔のチャンネルを開けて、サイズが500nm未満の分子の拡散を可能とする。これらのチャンネルは、用量および製剤に応じて24~48時間にわたり、その状態のままである。そのようなチャンネルは、流体、小分子、タンパク質、核酸および遺伝子治療ベクターならびにサイズが500nm未満の他の分子のような外来的に加えられる分子の拡散を促進させるために使用することができる。

30

【 0 0 4 8 】

sHASEGPは同様に、虚血再灌流、炎症、動脈硬化、浮腫、がん、脊髄損傷の後に生ずるものおよび他の形態の癍痕のような過剰なグリコサミノグリカンを除去するために使用することができる。場合によっては、sHASEGPを静脈内注射により全身に輸送することができる。これは、心臓もしくは脳のような局所接近を容易に利用できないときにまたは疾患が体中に存在する散在性の腫瘍の場合に有用とすることができる。過シアル化sHASEGPタンパク質は、末端シアル酸がない天然ヒアルロニダーゼ酵素と比べて血中半減期および分布を増大させるのに好ましい。

40

【 0 0 4 9 】

脊髄損傷、緑内障、および美容整形術のような一定の状況下では、持続的送達が好ましい。

【 0 0 5 0 】

その他の適応では、単回の短期作用用量が好ましい。グリコサミノグリカンの一時的除去を利用して、間質腔への溶液および薬物の送達を促進させることができる。これは麻酔の拡散にならびに治療用の流体、分子およびタンパク質の投与に有用とすることができる。sHASEGPタンパク質の存在下での分子の皮下および筋内投与は同様に、その全身分布をより迅速に促進させる。そのような方法は、静脈内投与を利用できないときにまたは分子

50

のより迅速な全身送達が必要とされる場合に非常に有用である。第VIII因子のような他の大きな分子の送達は、皮下投与では生体利用率が低く、sHASEGPタンパク質とともに注入して、その生体利用率を増大させてもよい。

【0051】

卵母細胞周囲の卵丘マトリックスの酵素的除去のためのsHASEGPタンパク質の使用が同様に提供される。抽出物由来ヒアルロニダーゼの有害混入物がない精製sHASEGPを用いた卵丘マトリックスの除去は、卵母細胞のいっそう穏やかな回収をより高い生存度で可能とする。さらに、sHASEGPタンパク質は、ウシ抽出物またはウイルスおよび感染性海綿状脳症のような他の病原体を持つ他の生物を使用せずとも製造することができる。

【0052】

眼内用途のための少容量のsHASEGPの注入を同様に小腔に使用してもよい。sHASEGPを前眼房に注入して、手術の間に投与される過剰な粘弾性物質を除去することができる。sHASEGPの眼内注入を同様に利用して、緑内障で眼内圧を低下させる、眼の硝子液の凝集物、または「浮遊物」を溶解させる、黄斑変性症の治療のため、硝子体出血を取り除く、糖尿病性網膜症で硝子体網膜剥離を促進させるおよび他の酵素と混合し矯正レンズに沿った角膜の形状変化を促進させることができる。場合によっては、ペグ化sHASEGPのような長期的に持続するsHASEGPの使用が望ましいことが認識されるであろう。

【0053】

sHASEGPの他の物質との共製剤が同様に少容量または迅速な皮下投与のための注射ペン向けに想定されてもよい。Epipen(登録商標)のような実例、インスリン、および他の流体を製剤化することができる。本発明の方法は、他の治療用分子の投与前の、投与時または投与後のsHASEGPポリペプチドまたはsHASEGPを含有する薬学的組成物の投与を含む。sHASEGPは治療用分子の投与部位と異なる部位に投与されてもよく、またはsHASEGPは治療用分子の投与部位と同じ部位に投与されてもよい。

【0054】

故に、本明細書で提供されるのは、sHASEGPと呼ばれる真核生物の分泌型の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質のファミリー、およびその機能ドメイン、特にヒアルロニダーゼ(または触媒)ドメイン、その突然変異タンパク質ならびに他の誘導体および類似体である。本明細書で同様に提供されるのは、sHASEGPをコードする核酸である。さらに提供されるのは、疾患を治療するためのおよび組織修飾酵素として用いるための前記sHASEGPの製剤および治療用途である。

【0055】

発明の詳細な説明

A. 定義

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、本発明が属する当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本明細書の開示全体を通じて参照される全ての特許、特許出願、公開された出願および刊行物、Genbank配列、ウェブサイトならびに他の公開資料は、特記しない限り、その全体が参照として組み入れられる。本明細書の用語に複数の定義が存在するという場合には、この項のものが優先する。

【0056】

URLまたは他のそのような識別子もしくはアドレスを参照する場合、そのような識別子は変わる可能性がありおよびインターネット上の特定の情報は移り変わる可能性があるが、等価な情報はインターネットを検索することにより見出すことができるということが理解されよう。その参照は、そのような情報の有効性および公開の証拠となる。

【0057】

本明細書では、任意の保護基、アミノ酸および他の化合物に対する略語は、特記しない限り、その一般的な用法、認められている略し方、またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会(1972) Biochem. 11 : 942-944を参照されたい)に従う。

【0058】

本明細書では、真核生物のヒアルロニダーゼとは、グリコサミノグリカンエンドグルコ

10

20

30

40

50

サミニダーゼの多様なファミリーであって、ヒアルロニダーゼのグルタミン酸残基がヒアルロナンとコンドロイチン硫酸の -1,4結合を酸-塩基触媒機構により加水分解するファミリーを指す。

【0059】

特に対象とするのは、ヒトを含む哺乳類由来のsHASEGPである。当業者は、概して、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させないことを認識している(例えば、Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224を参照されたい)。

【0060】

本明細書では、膜結合sHASEGPとは、本明細書に記述されるような共通の構造的特徴を共有する膜結合ヒアルロニダーゼのファミリーを指す。

10

【0061】

本明細書では、可溶性ヒアルロニダーゼとは、生理条件下でのその溶解性により特徴付けられるポリペプチドを指す。可溶性HASEGPは、例えば、37℃まで温められたTriton X-114溶液の水相中へのその分配により識別することができる(Bordier et al J Biol Chem. 1981 Feb 25;256(4):1604-7)。脂質結合HASEGPはいっぽう、界面活性剤に富む相中へ分配されるが、ホスホリパーゼ-Cによる処理後、界面活性剤の少ない相または水相中へ分配される。

【0062】

したがって、例えば、「sHASEGP」への言及には、ヒトsHASEGP、マウスsHASEGP、または任意の他の供給源から得られるもしくは合成的に調製されているまたは同じ活性を示す等価な分子を含むが、これらに限定されない、sHASEGP遺伝子ファミリーによりコードされる全ての糖タンパク質が包含される。典型的なsHASEGPおよび/またはそのドメインのコード化核酸分子の配列およびそのコードされるアミノ酸配列は、例えば、SEQ ID NO: 4に記載されている。この用語は同様に、各メンバーの活性を実質的に変化させないアミノ酸置換を有するsHASEGPを包含し、および同様にそのスプライス変異体を包含する。アミノ酸の保存的置換を含む適当な置換は、必ずではないが、当業者に知られており、生ずる分子の触媒活性などの生物活性をなくすことなく行うことができる。

20

【0063】

本明細書では、sHASEGPは、本明細書で言及される場合はいつでも、次の少なくとも一つもしくは全てまたは任意の組み合わせを含む: SEQ ID NO. 6に記載のヌクレオチドの配列によりまたはSEQ ID NO. 1のアミノ酸1~509をコードするヌクレオチドを含むヌクレオチドの配列によりコードされるポリペプチド; SEQ ID NO. 6に記載のヌクレオチドの配列に低度の、中等度のまたは高度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの配列によりコードされるポリペプチド; SEQ ID NO. 1のアミノ酸1~509として記載のアミノ酸の配列を含むポリペプチド; SEQ ID NO.1に記載のまたはSEQ ID NO. 4のアミノ酸1~448として記載のアミノ酸の配列と少なくともとも約60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチド。

30

【0064】

具体的には、SEQ ID NO. 4に示されるようなヒアルロニダーゼドメインを有するsHASEGPポリペプチドが提供される。このポリペプチドは一本鎖または二本鎖のポリペプチドである。ヒアルロニダーゼ活性を保持するそのもっと小さな部分も提供される。sHASEGPのヒアルロニダーゼドメインは、表面ループ中の挿入および欠失を含めて、サイズおよび組成がさまざまである。したがって、本明細書の目的の場合、触媒ドメインは、本明細書で定義されるような、sHASEGPの一部であり、および以前に同定されているHYAL1、HYAL2、HYAL3のような、他のヒアルロニダーゼ様配列のドメインに相通的である; しかしながら、単離された一本鎖型のヒトヒアルロニダーゼドメインはインビトロアッセイで機能できることが確認されなかった。活性に必要なアスパラギン酸およびグルタミン酸残基は保存モチーフに存在する。

40

50

【 0 0 6 5 】

本明細書では「可溶性sHASEGPの中性ヒアルロニダーゼドメイン」は、中性pHでヒアルロニダーゼ活性を示すsHASEGPの1,4エンドグルコサミニダーゼドメインを指し、前記の条件下で可溶性でありならびにヒアルロニダーゼグリコシル-ヒドロラーゼ・ファミリーのドメインと相溶性および構造的特徴を共有するが中性活性に必要とされるさらなる配列をカルボキシル末端に含む。故に、それは標準的なインビトロアッセイにより評価されるようなヒアルロニダーゼ活性を示しかつ可溶性のままであるドメインの少なくとも最小部分である。本明細書で企図されるのは、そのようなヒアルロニダーゼドメインおよび触媒的に活性なその一部分である。同様に提供されるのは、ヒアルロニダーゼドメインの切断型であり、一本鎖型として触媒的に作用するその最も小さな断片を含む。

10

【 0 0 6 6 】

sHASEGPのヒアルロニダーゼドメインは、本明細書で言及される場合はいつでも、次の少なくとも一つもしくは全てまたは任意の組み合わせまたは触媒的に活性な部分を含む：SEQ ID NO. 1に記載のアミノ酸の配列を含むN-結合糖タンパク質ポリペプチド；SEQ ID NO. 6に記載のヌクレオチドの配列に低度の、中等度のまたは高度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの配列によりコードされるポリペプチド；SEQ ID NO. 1に記載のアミノ酸の配列を含むポリペプチド；SEQ ID NO.1に記載のアミノ酸の配列と少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチド；および/またはsHASEGPのサプライズ変異体によりコードされるポリペプチドのヒアルロニダーゼドメイン。

20

【 0 0 6 7 】

したがって、本明細書の目的の場合、ヒアルロニダーゼドメインは、本明細書で定義されるような、sHASEGPの一部であり、および他のsHASEGPタンパク質のドメインに相通的である。sHASEGPの触媒ドメインは、ヒアルロニダーゼファミリーの酵素のもっと大きな部類と同様、高度のアミノ酸配列同一性を共有する。活性に必要なAspおよびGlu残基は保存モチーフに存在する。

【 0 0 6 8 】

活性型とはインビボおよび/またはインビトロで活性な型を指す。本明細書で記述されるように、ヒアルロニダーゼドメインは同様に可溶性の分泌糖タンパク質として存在することができる。少なくともインビトロで、sHASEGPの一本鎖型およびその触媒ドメインまたは酵素的に活性な部分(通常はC-末端切断)は、ヒアルロニダーゼ活性を示すことが本明細書で明らかである。故に、本明細書で提供されるのは、sHASEGPタンパク質のヒアルロニダーゼドメインの単離型およびその活性を調節する薬剤の同定のためのインビトロの薬物スクリーニングアッセイにおけるその用途である。

30

【 0 0 6 9 】

本明細書では、sHASEGPの触媒的に活性なドメインとは、グリコサミノグリカン基質に対するインビトロの活性により定義されるような中性活性エンドグルコサミニダーゼドメインを指す。

【 0 0 7 0 】

対象とするsHASEGPには、コンドロイチン硫酸およびコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)に対しインビボおよびインビトロで活性であるもの；ならびにヒアルロナンに対し活性であるものが含まれる。本明細書では、ヒトsHASEGPはヒトのゲノムに存在する、DNAのような核酸によりコードされるものであり、他の哺乳類で見出される変異体でないかぎり全ての対立遺伝子変異体および保存的変異を含む。

40

【 0 0 7 1 】

本明細書では「sHASEGPのヒアルロニダーゼドメインまたは触媒的に活性な部分をコードする核酸」とは、列挙される一本鎖ヒアルロニダーゼドメインまたはその活性な部分のみをコードし、sHASEGPの他の近接部分を連続的な配列としてコードしない核酸を指すと解釈されるものとする。

50

【 0 0 7 2 】

本明細書では「疾患」または「障害」とは、例えば、感染または遺伝的欠陥から生ずる、および識別可能な症状により特徴付けられる生物の病的状態を指す。

【 0 0 7 3 】

本明細書では、スプライス変異体とは、結果的に2種類以上のmRNAをもたらす、DNAのようなゲノム核酸の主要な転写産物の異なったプロセッシングにより産生される変異体を指す。sHASEGPのスプライス変異体が本明細書で提供される。

【 0 0 7 4 】

本明細書では、sHASEGPタンパク質のヒアルロニダーゼドメインとは、中性のエンドグルコサミニダーゼ活性を示すsHASEGPのヒアルロニダーゼドメインを指す。故に、それは標準的なインビトロアッセイにより評価されるようなエンドグルコサミニダーゼ活性を示すタンパク質の少なくとも最小部分である。典型的なヒトヒアルロニダーゼドメインは、SEQ ID NO. 4に記載されるアミノ酸の配列のうちエンドグルコサミニダーゼ活性を示すのに少なくとも十分な部分を含む。

10

【 0 0 7 5 】

同様に企図されるのは、インビトロヒアルロニダーゼアッセイでエンドグルコサミニダーゼ活性を有するポリペプチドをコードし且つsHASEGPポリペプチドのヒアルロニダーゼドメインの完全長と少なくとも70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するか、またはヒアルロニダーゼドメインをコードする核酸にその完全長に沿ってまたは完全長の少なくとも約70%、80%もしくは90%に沿って、特に中等度の、通常は高度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子である。

20

【 0 0 7 6 】

ヒアルロニダーゼドメインに対し、N-末端領域の残基は、十分ではないが活性に極めて重要であり得る。sHASEGPのヒアルロニダーゼドメインが触媒的に活性であることは本明細書で明らかである。故に、ヒアルロニダーゼドメインは通常、そのN-末端アミノ酸を活性に必要とし；C-末端部分は、至適に活性であるにはさらにアミノ酸を必要とするが、最後のシステイン残基まで切断することができる。除去できる程度は、触媒的切断を評価するインビトロアッセイでヒアルロニダーゼ活性についてポリペプチドを試験することにより実験的に決定することができる。

30

【 0 0 7 7 】

故に、ヒアルロニダーゼ活性を保持するヒアルロニダーゼドメインのそのもっと小さな部分、特に一本鎖ドメインが企図される。そのようなもっと小さな型は通常、ヒアルロニダーゼドメインのC-末端切断型である。ヒアルロニダーゼドメインは、表面ループ中の挿入および欠失を含めて、サイズおよび組成がさまざまである。そのようなドメインは、プロトン供与体のような、少なくとも一つの構造的特徴を含む、保存された構造、および/またはエンドグルコサミニダーゼのヒアルロニダーゼドメインの他の特徴を示す。したがって、本明細書の目的の場合、ヒアルロニダーゼドメインは、本明細書で定義されるようなsHASEGPの一本鎖部分であるが、他のヒアルロニダーゼ様配列のヒアルロニダーゼドメインと、その構造的特徴および類似性または相同性のある配列の保持という点で相同である。その糖タンパク質は、一本鎖としてヒアルロニダーゼ活性を示す。

40

【 0 0 7 8 】

本明細書では「相同な」とは、25%、40%、60%、70%、80%、90%または95%のような、およそ25%を超える核酸配列の同一性を指す。必要に応じて、パーセント相同性が特定される。「相同性」および「同一性」という用語は、多くの場合、同義的に使用される。一般に、配列は最大の適合度が得られるように整列される

(例えば、以下を参照されたい : *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing : Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part/*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et Al. (1988) et al. (1988) *Slam J Applied Math* 48] : 1073)

10

【 0 0 7 9 】

配列同一性とは、その保存アミノ酸の数が、標準的なアライメントアルゴリズム・プログラムにより決定され、各供給業者が定めた既定のギャップペナルティーで使用される。実質的に相同な核酸分子は通常、中等度のストリンジェンシーでまたは高度のストリンジェンシーで、核酸の長さの端から端に沿ってまたは対象とする完全長の核酸分子の少なくとも約70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズするであろう。同様に企図されるのは、ハイブリダイズする核酸分子中のコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子である。

20

【 0 0 8 0 】

任意の二つの核酸分子が少なくとも、例えば、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一」であるヌクレオチド配列を有するかどうかは、「FASTA」プログラムのような既知のコンピュータプログラムにより、例えば、Pearson et al (1988) [*Proc. Natl . Acad. Sci. USA* 85]: 2444 (他のプログラムはGCGプログラムパッケージを含む

(Devereux, J., et al, *Nucleic*

Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, [ED., Academic Press, San Diego, 1994, and [CARILLO ETA/.] (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073)

30

にあるような既定のパラメータを用いて決定することができる。例えば、米国立バイオテクノロジー情報センター・データベースのBLAST機能を利用して、同一性を決定することができる。他の商業的にまたは公に利用できるプログラムには、DNASTARの「MEGALIGN」プログラム(Madison, WI)およびウイスコンシン大学のGenetics Computer Group (UWG)「Gap」プログラム(Madison WI)が含まれる。タンパク質および/または核酸分子のパーセント相同性または同一性は、例えば、GAPコンピュータプログラム(例えば、Needleman et al. (1970), *J Mol Biol.* 48: 443, Smith and Waterman *Adv. Appl. Math* (1981) 2:48 2により修正されているような)を用いて、配列情報を比較することにより決定することができる。簡単に言えば、GAPプログラムは、類似である整列された記号(すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸)の数を、二つの配列のうち短いほうの記号の総数で割ったものとして類似度を定義する。GAPプログラムに対する既定のパラメータには、以下が含まれる:

40

(1) Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)により記述されているように、単項比較行列(同一に対し1および非同ーに対し0の値を含む)およびGribskov et al (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745の重み付け比較行列(weighted comparison matrix); (2) 各ギャップに対し3.0のペナルティーおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティー; ならびに(3) 末端ギャップに対しペナルティーなし。したがって、本明細

50

書では「同一性」という用語は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の比較を表す。

【0081】

本明細書では、少なくとも「90%同一」という用語は、参照ポリペプチドに対し90から99.99までのパーセント同一性を指す。90%またはそれ以上のレベルの同一性は、例証の目的で、100アミノ酸からなる試験および参照のポリヌクレオチド長が比較されると仮定して、試験ポリペプチドの10%(すなわち、100のうち10)以下のアミノ酸が参照ポリペプチドのものと異なるという事実を示す。同様の比較を試験および参照ポリヌクレオチドの間で行うことができる。そのような相違は、アミノ酸配列の全長にわたり無作為に分布している点突然変異として表すことができる、またはそれらは、最大許容の、例えば10/100アミノ酸の相違(約90%の同一性)までのさまざまな長さで一つまたは複数の位置に密集することができる。相違は核酸またはアミノ酸の置換、または欠失と定義される。約85~90%を超える相同性または同一性のレベルで、結果はプログラムおよび設定されるギャップパラメータには無関係となるはずである; そのような高いレベルの同一性は、たいていソフトウェアに頼らなくても、容易に評価することができる。

10

【0082】

本明細書では、プライマーとは、2つまたはそれ以上の、通常は4つ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであって、そこからプライマー伸長産物の合成を開始させることができるオリゴヌクレオチドを指す。合成に寄与する実験条件には、ヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼのような、重合および伸長のための作用物質の存在、ならびに適当な緩衝液、温度およびpHが含まれる。

20

【0083】

本明細書では、動物は、以下に限定されることはないが、ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジ、齧歯類、ブタおよびヒトのような任意の動物を含む。ヒト以外の動物とは、企図する動物としてヒトを除外する。本明細書で提供されるsHASEGPは、任意の供給源、つまり動物、植物、原核生物および真菌に由来する。大部分のsHASEGPは、哺乳動物由来を含めて、動物由来のものである。

【0084】

本明細書では、遺伝子治療は、そのような治療が求められる障害または病状がある哺乳動物、特にヒトの特定細胞、つまり標的細胞への異種の核酸(例えばDNA)の移入を含むことができる。核酸(例えばDNA)は、その異種の核酸(例えばDNA)が発現されて、その核酸によりコードされる治療産物が産生されるような方法で選択の標的細胞に導入される。

30

【0085】

あるいは、異種の核酸(例えばDNA)は治療産物をコードするDNAの発現をある方法で媒介することができる、またはそれは、ある方法で治療産物の発現を直接的にまたは間接的に媒介するペプチドまたはRNAのような産物をコードすることができる。遺伝子治療を同様に利用して、欠陥遺伝子に置き換わる、または導入対象の哺乳類もしくは細胞により産生される遺伝子産物を補完する、遺伝子産物をコードする核酸を送達することができる。導入される核酸は、哺乳類宿主で通常は産生されないまたは治療的に有効な量でもしくは治療的に有用な時に産生されない、治療化合物(例えばその増殖因子阻害物質)または腫瘍壊死因子もしくはその阻害物質(例えばそれに対する受容体)をコードすることができる。治療産物をコードする異種の核酸(例えばDNA)は、産物またはその発現を促進させるかまたは別の方法で変化させるため、罹患宿主の細胞への導入前に修飾することができる。遺伝子治療は同様に、阻害物質もしくは抑制物質または遺伝子発現の他の調節物質の送達を含むことができる。

40

【0086】

本明細書では、異種の核酸とは、発現対象の細胞により通常はインビボで産生されないRNAおよびタンパク質をコードする核酸であるか、または転写、翻訳、もしくは他の調節可能な生化学過程に影響を及ぼすことにより、内在性の核酸、例えばDNAの発現を変化させる介在物質を媒介するかもしくはコードする核酸である。異種の核酸(例えばDNA)は同

50

様に、外来の核酸(例えばDNA)ということができる。当業者により発現対象の細胞に対し異種または外来と認識されるかまたは見なされるであろう任意の核酸(例えばDNA)は、本明細書で異種の核酸により網羅される; 異種の核酸は外来的に付加される核酸であって、同様に外来的に発現される核酸を含む。異種の核酸の例は、以下に限定されることはないが、薬剤耐性を与えるタンパク質のような、追跡可能なマーカータンパク質をコードする核酸、抗がん性の作用物質、酵素およびホルモンのような、治療的に有効な物質をコードする核酸、ならびに抗体のような、他のタイプのタンパク質をコードする核酸(例えばDNA)を含む。異種の核酸によりコードされる抗体は、分泌させることができる、またはその異種の核酸が導入されている細胞の表面に発現させることができる。

【0087】

異種の核酸は一般に、導入対象の細胞に対し内在性ではないが、別の細胞から得られているかまたは合成的に調製されている。

【0088】

一般に、必ずではないが、そのような核酸は、発現対象の細胞により通常は産生されないRNAおよびタンパク質をコードする。

【0089】

本明細書では、治療的に有効な産物とは、宿主への核酸の導入により、遺伝性もしくは後天性の疾患の症状、徴候を改善するかもしくは取り除くまたは疾患を治療する産物が発現される異種の核酸、通常はDNAによりコードされる産物である。

【0090】

本明細書では、糖タンパク質は本質的にヒアルロニダーゼドメインからなるという詳説は、ポリペプチドのうちの唯一のsHASEGP部分がヒアルロニダーゼドメインまたは触媒的に活性なその一部分であることを指す。ポリペプチドは、sHASEGP由来ではないさらなるアミノ酸の配列を任意に含むことができ、一般的に含まれるであろう。

【0091】

本明細書では、ドメインとは、ある分子、例えば、糖タンパク質またはそのコード化核酸の一部分であって、その分子の他の部分とは構造的におよび/または機能的に異なる部分を指す。

【0092】

本明細書では、ヒアルロニダーゼとは、グリコサミノグリカンの加水分解を触媒する酵素を指す。

【0093】

明確にするため、ヒアルロニダーゼへの言及は全ての形態を指し、特定の形態は具体的に指定される。本明細書の目的の場合、ヒアルロニダーゼドメインは、sHASEGPタンパク質の膜結合型および可溶型を含む。

【0094】

本明細書では、核酸とは、タンパク質核酸(PNA)およびその混合物を含めて、DNA、RNAおよびその類似体を含む。核酸は一本鎖または二本鎖とすることができる。蛍光標識または放射性標識のような検出可能な標識で、任意に標識される、プローブまたはプライマーに言及する場合、一本鎖の分子が企図される。そのような分子は通常、その標的が実質的に特異となるような長さのものまたはライブラリーをプロービングするかもしくはプライミングするために低コピー数(典型的に5未満、一般に3未満)のものである。一般に、プローブまたはプライマーは、対象とする遺伝子に相補的なまたは同一な配列を連続して少なくとも14、16または30(残基)含む。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100またはそれ以上の核酸長とすることができる。

【0095】

本明細書では、sHASEGPの断片または一部分をコードする核酸とは、列挙されるsHASEGPの断片または一部分のみをコードし、sHASEGPの他の近接部分をコードしない核酸を指す。

【0096】

10

20

30

40

50

本明細書では、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳終結部位、ならびに他のシグナル配列のような、ヌクレオチドの調節およびエフェクター配列との異種の核酸の作動可能な連結とは、そのような核酸と(例えばDNA)そのようなヌクレオチドの配列との間の関係を指す。例えば、プロモーターとの異種DNAの作動可能な連結とは、そのようなDNAの転写がそのプロモーターから、これを特異的に認識し、これに結合して読み枠のDNAを転写するRNAポリメラーゼにより開始されるようなDNAとプロモーターとの間の位置的关系を指す。したがって、作動可能に連結されたまたは作動的に関連付けられたとは、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳終結部位、ならびに他のシグナル配列のような、ヌクレオチドの調節およびエフェクター配列との、DNAのような、核酸の機能的関係を指す。例えば、プロモーターとの異種DNAの作動可能な連結とは、そのようなDNAの転写がそのプロモーターから、これを特異的に認識し、これに結合してDNAを転写するRNAポリメラーゼにより開始されるようなDNAとプロモーターとの間の位置的小および機能的関係を指す。発現および/またはインビトロの転写を最適化するため、クローンの5'非翻訳部分を除去、付加または改変して、余分な、潜在的に不適切な別の翻訳開始コドンまたは転写もしくは翻訳の段階で、発現を妨害し得るかもしくは低下させ得る他の配列を取り除くことが必要になり得る。または、コンセンサスリボソーム結合部位(例えば、Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991)を参照されたい)を開始コドンのすぐ5'側に挿入することができ、そして発現を促進させることができる。そのような修飾の望ましさ(必要性)は、実験的に決定することができる。

10

【0097】

20

本明細書では、アンチセンスオリゴヌクレオチドに関連して、RNAの少なくとも一部分に相補的な配列とは、一般に中等度または高度のストリンジェンシー条件下で、RNAとハイブリダイズできるだけ十分な相補性を有し、安定な二本鎖を形成する配列を指す; 二本鎖sHASEGPのアンチセンス核酸の場合、二本鎖DNA(またはdsRNA)の一本鎖をこのように試験することができる、または三本鎖の形成をアッセイすることができる。ハイブリダイズ能は、相補性の度合いおよびアンチセンス核酸の長さに依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長くなるほど、sHASEGPをコードするRNAとのその核酸が含み得る塩基ミスマッチは多くなるが、それでも安定な二本鎖(または場合により、三本鎖)を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融解点を決定するための標準的な手順を用いて、容認できるミスマッチの度合いを確定することができる。

30

【0098】

本明細書の目的の場合、アミノ酸置換は、結果的に生ずるタンパク質がヒアルロニダーゼ活性を示すならば、sHASEGPおよびそのヒアルロニダーゼドメインのいずれでも行うことができる。企図されるアミノ酸置換には、タンパク質分解活性をなくさない、表1に記載されるもののような保存的置換が含まれる。本明細書で記述されるように、切断部位および他のそのような部位の除去のような、タンパク質の特性を変化させる置換が同様に企図される; そのような置換は一般に非保存的性であるが、当業者により容易に達成されることができる。

【0099】

アミノ酸の適当な保存的置換は、当業者に知られており、結果的に生ずる分子の生物活性、例えば酵素活性を変化させることなく一般に行われることができる。当業者は、概して、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は、実質的に生物活性を変化させないことを認識している(例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224を参照されたい)。同様に定義のなかに含まれるのは、sHASEGPの触媒的に活性な断片、特に一本鎖のヒアルロニダーゼ部分である。保存的アミノ酸置換は、例えば、下記の表1に記載されているものにしたがって行われる:

40

【0100】

(表1) オリジナル残基の保存的置換

Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg

(R) Lys, orn Asn (N) Gln ; His Cys (C) Ser Gin (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala ; Pro
His (H) Asn; Gin Ile (I) Leu; Val ; Met; Nle ; Nva Leu (L); Val ; Met; Nle ; Nv Lys (K)
Arg; Gin ; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile ; NLe Val Ornithine Lys; Arg Phe (F) Met; Leu; Tyr
Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle ; Nv

この他の置換も許容することができ、実験的にまたは既知の保存的置換に合わせて決定することができる。

10

【 0 1 0 1 】

本明細書では、Abuは2-アミノ酪酸であり；Ornはオルニチンである。本明細書では、本明細書に挙げられるさまざまなアミノ酸配列に現れるアミノ酸は、そのよく知られている、3文字または1文字略号により識別される。さまざまなDNA断片に現れるヌクレオチドは、当技術分野において日常的に使用される標準的な1文字表記で指定される。

【 0 1 0 2 】

本明細書では、本明細書に開示されるヌクレオチド配列に基づくプローブまたはプライマーには、SEQ ID NO. 6のヌクレオチドが少なくとも10、14、通常は少なくとも16個連続した配列、およびSEQ ID NO. 6のヌクレオチドの少なくとも30、50または100個連続した配列のプローブが含まれる。特異的なハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーの長さは、対象とするゲノムの複雑さの関数になる。

20

【 0 1 0 3 】

本明細書では、特定の薬学的組成物の投与による特定障害の症状の改善とは、永久的であれ一時的であれ、持続的であれ一過的であれ、組成物の投与に起因するまたは付随するとできる任意の緩和を指す。

【 0 1 0 4 】

本明細書では、アンチセンスポリヌクレオチドとは、mRNAまたは二本鎖DNAのセンス鎖に相補的なヌクレオチド塩基の合成配列を指す。センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドを適当な条件下で混合することで、この二つの分子の結合、またはハイブリダイゼーションに至る。これらのポリヌクレオチドがmRNAに結合(とハイブリダイズ)する場合、タンパク質合成(翻訳)の障害が起こる。これらのポリヌクレオチドが二本鎖DNAに結合する場合、RNA合成(転写)の障害が起こる。

30

【 0 1 0 5 】

翻訳および/または転写の結果的に起こる障害により、センス鎖によりコードされるタンパク質の合成の障害につながる。アンチセンス核酸分子は、通常、標的核酸に特異的に結合するのに十分な数のヌクレオチド、一般に少なくとも5連続ヌクレオチド、たいてい少なくとも14もしくは16もしくは30連続ヌクレオチドまたは対象とする遺伝子をコードする核酸分子のコード部分、例えば、sHASEGPの一本鎖ヒアルロニダーゼドメインをコードする核酸に相補的な修飾ヌクレオチドを含む。

【 0 1 0 6 】

本明細書では、アレイとは、三つまたはそれ以上のメンバーを含む、抗体のような成分の一群を指す。アドレス可能アレイは、アレイのメンバーを通常は固相支持体上の位置により特定可能なものである。それ故、一般にアレイのメンバーは、固相表面上の個別の特定可能な位置に固定化される。

40

【 0 1 0 7 】

本明細書では、抗体とは、天然であろうがまたは部分的にもしくは全体的に合成によって産生されようが、抗体の特異的結合能を保持するその任意の誘導体を含む、免疫グロブリンを指す。故に、抗体には、免疫グロブリン結合ドメインに相同なまたは実質的に相同な結合ドメインを有する任意のタンパク質が含まれる。抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含む、いずれかの免疫グロブリンクレーム(claim)のメンバーが含まれる。

50

【0108】

本明細書では、抗体断片とは、完全長抗体の特異的結合能の少なくとも一部を保持している、完全長よりも短い抗体の任意の誘導体を指す。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(AB)2、一本鎖Fvs (scFV)、FV、dsFV二重特異性抗体(diabody)およびFd断片を含むがこれらに限定されることはない。断片は、例えばジスルフィド架橋により、互いに連結された複数の鎖を含むことができる。抗体断片には、一般に少なくとも約50アミノ酸および典型的に少なくとも200アミノ酸が含まれる。

【0109】

本明細書では、Fv抗体断片は、非共有相互作用により連結された1本の可変重鎖ドメイン(VH)と1本の可変軽鎖ドメインとからなる。

10

【0110】

本明細書では、dsFVとは、遺伝子工学で作り変えた分子間ジスルフィド結合を有するFvを指す。

【0111】

本明細書では、F(AB)2断片は、pH4.0~4.5でペプシンを用いた免疫グロブリンの消化から生ずる抗体断片である；これを組換え発現させて、等価な断片を産生することができる。

【0112】

本明細書では、Fab断片は、パピンを用いた免疫グロブリンの消化から生ずる抗体断片である；これを組換え発現させて、等価な断片を産生することができる。

20

【0113】

本明細書では、scFVとは、ポリペプチドリinkerにより任意の順序で共有結合的に連結された可変軽鎖Vと、可変重鎖(VH)とを含む抗体断片を指す。リンカーは、二つの可変ドメインが実質的な干渉なしに架橋されるような長さのものである。包含されるリンカーは、溶解性を高めるためにいくつかのGluまたはLys残基が端から端に分散されている(Gly-Ser)n残基である。

【0114】

本明細書では、ヒト化抗体とは、ヒトへの投与により免疫反応が引き起こされないようにヒトのアミノ酸の配列を含むように修飾される抗体を指す。そのような抗体の調製方法が知られている。例えば、そのような抗体を産生するため、モノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマまたは大腸菌もしくはCHO細胞のような、他の原核細胞もしくは真核細胞を組換えDNA技術により改変して、非可変領域のアミノ酸組成がヒトの抗体に基づく抗体を発現させる。そのような領域を同定するため、コンピュータプログラムが設計されている。

30

【0115】

本明細書では、二重特異性抗体は二量体scFVである；二重特異性抗体は通常、scFvよりも短いペプチドリinkerを有し、それらが一般に二量体化する。

【0116】

本明細書では、組換えDNA法を利用した組換え手段による産生とは、クローニングされたDNAによりコードされるタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法の利用を指す。

40

【0117】

本明細書では、評価するという用語は、試料中に存在する、sHASEGP、またはそのドメインの活性に対する絶対値を得る、および同様に活性のレベルを示す指数、比率、パーセンテージ、視覚によるまたは他の値を得るという意味での定量的および定性的な決定を含むように意図される。評価は直接的または間接的とすることができ、実際に検出される化学種は、もちろんタンパク質分解産物そのものである必要はないが、例えば、その誘導体または何らかのさらなる物質とすることができる。

【0118】

本明細書では、生物活性とは、化合物、組成物または他の混合物のインビボ投与により

50

生じる化合物のインビボ活性または生理学的反応を指す。生物活性には、したがって、そのような化合物、組成物および混合物の治療効果および薬学的活性が包含される。生物活性は、そのような活性を試験するかまたは利用するために設計されたインビトロ系で観測されることができる。したがって、本明細書の目的の場合、ルシフェラーゼの生物活性とはそのオキシゲナーゼ活性であり、その活性により、基質の酸化時に、光が発せられる。

【0119】

本明細書では、機能的活性とは、完全長のタンパク質に付随する一つまたは複数の活性を示すポリペプチドまたはその一部分を指す。

【0120】

機能的活性は、以下に限定されることはないが、生物活性、触媒または酵素活性、抗原性(抗ポリペプチド抗体との結合に対しポリペプチドに結合するかまたはポリペプチドと競合する能力)、免疫原性、多量体を形成する能力、ポリペプチドに対する受容体またはリガンドに特異的に結合する能力を含む。

【0121】

本明細書では、抱合体とは、一つまたは複数のsHASEGP(一つのsHASEGPを含む)、特にその一本鎖ヒアルロニダーゼドメインと、一つまたは複数の標的化合物とを含む本明細書で示される化合物を指す。これらの抱合体は、融合タンパク質として組換え手段により産生されるもの、化学的カップリングによる、例えば、スルフヒドリル基とのカップリングによるような化学的手段により産生されるもの、およびその他の任意の方法により産生されるものであって、その結果、少なくとも一つのsHASEGP、またはそのドメインが標的化合物に直接的にまたはリンカーを介して間接的に連結されるものを含む。

【0122】

本明細書では、標的化合物とは、細胞表面受容体との抱合体の特異的結合を供与する、タンパク質またはその効果的な部分のような、任意の成分であって、これは、抱合体またはそのsHASEGP部分を内在化させることができる。標的化合物は同様に、例えば、抱合体のアフィニティー単離もしくは精製；表面への抱合体の付着；または抱合体もしくは抱合体を含む複合体の検出を促進するまたは容易にするものとすることができる。

【0123】

本明細書では、抗体抱合体とは、標的化合物が抗体である抱合体を指す。

【0124】

本明細書では、分子の誘導體または類似体とは、分子から派生する一部分または分子の修飾型を指す。

【0125】

本明細書では、特定の疾患を治療するための化合物の有効量とは、疾患に付随する症状を改善するか、またはある種の方法で軽減するのに十分な量である。そのような量を単回用量として投与することができる、またはその用量が効果的になる投薬計画にしたがって投与することができる。その量は疾患を治療することができるが、通常、疾患の症状を改善するために投与される。症状の望ましい改善を達成するのに、反復投与が必要とされることができる。

【0126】

本明細書では、等価(な)とは、二つの核酸の配列に言及する場合、問題の二つの配列が同じ配列のアミノ酸または等価なタンパク質をコードすることを指す。等価(な)が二つのタンパク質またはペプチドに言及する際に使用される場合、これは、二つのタンパク質またはペプチドがタンパク質またはペプチドの活性または機能を実質的に変化させないアミノ酸置換(例えば、限定ではないが、上記表1に記載されるもののような保存的变化)だけを伴う実質的に同じアミノ酸配列を有することを指す。特性について等価(な)とは、その特性が同程度にまで存在している必要はないが、その活性は通常、実質的に同じである(例えば、二つのペプチドが異なる比率の同タイプの酵素活性を示すことができる)。相補的(な)とは、二つのヌクレオチド配列に言及する場合、二つのヌクレオチドの配列が、対向するヌクレオチド間で通常、25%、15%、5%または0%未満のミスマッチでハイブリダイズ

10

20

30

40

50

できることを指す。必要に応じて、相補性のパーセンテージが特定される。通常、その二つの分子は、高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするように選択される。

【0127】

本明細書では、タンパク質の活性または遺伝子もしくは核酸の発現を調節する薬剤は、タンパク質の活性を減少させるかもしくは増加させるかまたは別の方法で変化させる、またはある種の方法で細胞中の核酸の発現を上方もしくは下方制御するかまたは別の方法で変化させる。

【0128】

本明細書では、sHASEGPの活性の阻害物質には、sHASEGPの産生、翻訳後修飾、成熟、もしくは膜局在を妨げるかもしくは減らす任意の物質またはインビトロスクリーニングアッセイでsHASEGPの、特に一本鎖型のタンパク質分解効果を阻害するかもしくは減らす任意の物質が包含される。

10

【0129】

本明細書では、腫瘍性疾患を治療するまたは予防するための方法とは、腫瘍、その転移、腫瘍の血管新生またはこの疾患を特徴付ける他のパラメータのような、任意の症状が軽減される、改善される、予防される、寛解の状態に置かれる、または寛解の状態に維持されることを指す。それは同様に、腫瘍性疾患および転移の顕著な特徴が治療により取り除かれる、軽減されるまたは予防されることができるとを指す。顕著な特徴の非限定的な例には、基底膜および近位の細胞外マトリクスの無制御分解、遊走、分裂、および新たな機能性毛細血管中での内皮細胞の組織化、およびそのような機能性毛細血管の持続が含まれる。

20

【0130】

本明細書では、抱合体の薬学的に許容される塩、エステルまたは他の誘導体には、当業者がそのような誘導体化のための既知の方法を利用して容易に調製でき且つ実質的な有毒作用なしに動物またはヒトに投与できる化合物をもたらす且つ薬学的に活性であるかまたはプロドラッグである任意の塩、エステルまたは誘導体が含まれる。

【0131】

本明細書では、プロドラッグとは、インビボ投与により、化合物の生物学的に、薬学的にまたは治療的に活性な形態に代謝されるかまたは別の方法で変換される化合物である。プロドラッグを産生するため、薬学活性化合物をその活性化合物が代謝過程により再生されるように修飾する。プロドラッグは、薬物の代謝的安定性もしくは輸送特性を変えるか、副作用もしくは毒性を遮断するか、薬物の香味を改善するかまたは薬物の他の特徴もしくは特性を変えるように設計することができる。インビボでの薬力学的プロセスおよび薬物代謝に関する知識に照らして、当業者は、いったん薬学的に活性な化合物が分かれば、その化合物のプロドラッグを設計することができる(例えば、Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392を参照されたい)。

30

【0132】

本明細書では、本明細書に示されるスクリーニング方法により同定される薬物とは、治療化合物としてまたは治療化合物の設計用のリード化合物として用いるための候補となる任意の化合物を指す。そのような化合物は、有機小分子、ペプチド、ペプチド模倣体、アンチセンス分子またはRNAiのようなdsRNA、抗体、抗体の断片、組換え抗体および薬物候補またはリード化合物としての機能を果たすことができる他のそのような化合物を含む、小分子とすることができる。

40

【0133】

本明細書では、ペプチド模倣体とは、特定のペプチドの生物学的活性型の高次構造およびある種の立体化学的特徴を模倣する化合物である。一般に、ペプチド模倣体は、化合物のある種の望ましい特性を模倣するように、しかし生物学的に活性な高次構造の喪失や結合の断絶をもたらす、可動性のような、望ましくない特性を模倣しないように設計される。ペプチド模倣体は、望ましくない特性の一因となる特定の基または結合を生物学的等価

50

体(bioisoster)に置換することにより生物学的に活性化化合物から調製されることができ
る。生物学的等価体は当業者に知られている。例えば、メチレンの生物学的等価体CH₂Sは
、エンケファリン類似体でアミド置換として使用されている(例えば、Spatola (1983) pp
. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins,
Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New Yorkを参照されたい)。経口的に投与され
ることができるモルヒネは、ペプチドのエンドルフィンのペプチド模倣体である化合物で
ある。本明細書の目的の場合、環状ペプチドがペプチド模倣体のなかに含まれる。

【0134】

本明細書では、プロモーター領域またはプロモーター要素とは、これが作動可能に連結
されたDNAまたはRNAの転写を制御するDNAまたはRNAの断片を指す。プロモーター領域には
、RNAポリメラーゼによる認識、結合および転写開始に十分な特定の配列が含まれる。

10

【0135】

プロモーター領域のこの部分がプロモーターといわれる。さらに、プロモーター領域に
は、RNAポリメラーゼによるこの認識、結合および転写開始活性を調節する配列が含まれ
る。これらの配列はシス作動性とする事ができる、またはトランス作動性因子に反応す
ることができる。プロモーターは、調節の性質に応じて、恒常的とすることができるま
たは調節されることができる。原核生物で用いることが企図される典型的なプロモーター
には、バクテリオファージT7およびT3プロモーターが含まれる。

【0136】

本明細書では、受容体とは、所定のリガンドに親和性を有する分子を指す。受容体は天
然に存在する分子または合成分子とすることができる。受容体は当技術分野において抗リ
ガンドともいわれる。本明細書では、受容体および抗リガンドは置き替え可能である。受
容体はその未改変の状態または他の種との凝集体として使用されることができる。受容
体は、直接的にまたは特異的な結合物質もしくはリンカーを介して間接的に、結合メンバ
ーに共有結合的にもしくは非共有結合的に、または結合メンバーと物理的に接触した状態
で付着されることができる。受容体の例は、以下に限定されることはないが、抗体、細胞
膜受容体、表面受容体および内在性受容体、特定の抗原決定基[ウイルス、細胞、または
他の物質上のような]と反応するモノクローナル抗体および抗血清、薬物、ポリヌクレオ
チド、核酸、ペプチド、各因子、レクチン、糖質、多糖類、細胞、細胞膜、ならびに細胞
小器官を含む。

20

30

【0137】

受容体およびそのような受容体を用いる用途の例は、以下を含むがそれらに限定される
ことはない： a) 酵素： 特定の輸送タンパク質または微生物の生存に必須な酵素、これら
は抗生物質[リガンド]選択の標的として役立つ可能性がある； b) 抗体： 対象とする抗原
のエピトープと結合する抗体分子上のリガンド結合部位の同定について調べることができ
る； 抗原エピトープを模倣する配列を決定することで、免疫原がそのような配列の一つま
たは複数に基づくもののワクチンの開発につなげることができるまたは自己免疫疾患に対
するような治療上の処置に有用な関連診断薬もしくは化合物の開発につなげることができ
る； c) 核酸： タンパク質またはRNAのようなリガンド、結合部位の同定； d) 触媒ポリペ
プチド： 一つまたは複数の反応物質の一つまたは複数の産物への変換を含む化学反応を促
進させることができるポリペプチドを含むポリマー； そのようなポリペプチドは一般に、
少なくとも一つの反応物質または反応中間体に特異的な結合部位と結合部位に近接する活
性な官能性を含み、その官能性により、結合した反応物質を化学的に修飾することがで
きる(例えば、U. S. Patent No. 5,215,899を参照されたい)； e) ホルモン受容体： 受容
体に高い親和性で結合するリガンドの決定は、ホルモン補充療法の開発に有用である； 例
えば、そのような受容体に結合するリガンドを同定することで、血圧を制御する薬物の開
発につなげることができる； ならびに f) アヘン剤受容体： 脳内のアヘン剤受容体に結合
するリガンドの決定は、モルヒネおよび関連薬物に対し中毒性の低い代替物の開発に有用
である。

40

【0138】

50

本明細書では、試料とは、分析物アッセイが望まれる分析物を含み得るすべてのものを指す。試料は、生体液または生体組織のような、生体試料とすることができる。生体液の例には、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、糞便、喀痰、脳脊髄液、涙、粘液、精子、羊水または同様のものが含まれる。生体組織は、結合組織、上皮組織、筋肉組織および神経組織を含む、ヒト、動物、植物、細菌、真菌またはウイルス構造の構造物質の一つを形成する細胞の、通常は特定の種類の細胞のその細胞間質との凝集体である。生体組織の例には同様に、臓器、腫瘍、リンパ節、動脈および個別の細胞が含まれる。

【0139】

本明細書では、ミスマッチのパーセンテージを決定する際のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、次の通りである：1) 高度のストリンジェンシー：0.1×SSPE、0.1% SDS、65 2) 中等度のストリンジェンシー：0.2×SSPE、0.1% SDS、50 3) 低度のストリンジェンシー：1.0×SSPE、0.1% SDS、50。当業者は、洗浄段階により安定なハイブリッドが選択されることを承知しているおよび同様にSSPEの成分を承知している(例えば、Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press 1989 Vol 3, p. B. 13を参照されたい、同様によく利用される実験用溶液について記述している多くのカタログを参照されたい)。SSPEはpH7.4のリン酸緩衝 0.18 NaClである。さらに、当業者は、ハイブリッドの安定性がナトリウムイオン濃度および温度の関数である T_m ($T_m = 81.5 - 16.6 + 0.41 (\% G+C) - 600/L$)により決定され、したがってハイブリッドの安定性に極めて重要な洗浄条件の唯一のパラメータがSSPE(またはSSC)中のナトリウムイオン濃度および温度であることを認識している。

【0140】

等価なストリンジェンシーは別の緩衝液、塩および温度により達成できるということが理解されよう。限定ではなく一例として、低ストリンジェンシー条件を用いる手順は次の通りである(同様にShilo and Weinberg, Proc. Natl. Acad Sci USA 78: 6789-6792 (1981)を参照されたい)：DNAを含むフィルターを、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1%フィコール、1% BSA、および500 μg/ml 変性サケ精子DNA(10×)を含有する溶液中で40にて6時間予備処理する(SSCは、1.5M塩化ナトリウム、および0.15Mクエン酸ナトリウム溶液、pH7に調整)。

【0141】

ハイブリダイゼーションは、同じ溶液中で行うが次の変更を加える：0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100VG/M 精子DNA、10%(重量体積比)デキストラン硫酸、および5~20×10⁶ cpm ³²P標識プローブを使用する。フィルターをハイブリダイゼーション混合液中で40にて18~20時間インキュベートし、その後、2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSを含有する溶液中で55にて1.5時間洗浄する。洗浄液を新たな溶液に交換して、さらに60にて1.5時間インキュベートする。フィルターをプロットドライし、オートラジオグラフィーにかける。必要に応じて、フィルターを3度目は65~68にて洗浄し、フィルムに再露光させる。利用できる低ストリンジェンシーの他の条件は、(例えば、異種間のハイブリダイゼーションで利用されるように)当技術分野においてよく知られている。

【0142】

限定ではなく一例として、中等度のストリンジェンシーの条件を用いる手順には、例えば、限定するわけではないが、以下が含まれる(そのような中等度のストリンジェンシーの条件を用いる手順は次の通りである)：DNAを含むフィルターを、6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100 μg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中で55にて6時間予備処理する。ハイブリダイゼーションを同じ溶液中で行い、5~20×10⁶ ³²P標識プローブを使用する。フィルターをハイブリダイゼーション混合液中で55にて18~20時間インキュベートし、その後、1×SSCおよび0.1% SDSを含有する溶液中で60にて30分間2回洗浄する。フィルターをプロットドライし、オートラジオグラフィーにかける。利用できる中等度のストリンジェンシーの他の条件は、当技術分野においてよく知られている。フィル

ターの洗浄を、2×SSC、0.1% SDSを含有する溶液中で37℃にて1時間行う。

【0143】

限定ではなく一例として、高ストリンジェンシー条件を用いる手順は次の通りである：DNAを含むフィルターのプレハイブリダイゼーションを、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02%フィコール、0.02% BSA、および500 µg/ml 変性サケ精子DNAからなる緩衝液中で65℃にて8時間から一晩行う。フィルターを、100 µg/ml 変性サケ精子DNAおよび5～20×10⁶ cpm ³²P標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合液中で65℃にて48時間ハイブリダイズさせる。フィルターの洗浄を、2×SSC、0.01% PVP、0.01%フィコール、および0.01% BSAを含有する溶液中で37℃にて1時間行う。これを引き続いて、オートラジオグラフィーの前に0.1×SSC中で50℃にて45分間洗浄する。利用できる高ストリンジェンシーの他の条件は、当技術分野においてよく知られている。

10

【0144】

実質的に同一のまたは実質的に相同のもしくは類似のという用語は、当業者により理解されるような状況に応じて変化し、一般に少なくとも60%または70%の同一性を指し、好ましくは少なくとも80%、85%またはより好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%の同一性を指す。

【0145】

本明細書では、ある産物に実質的に同一とは、対象とする特性が十分に不変であるように十分に類似しており、したがってその産物の代わりに実質的に同一の産物を使用できることを指す。

20

【0146】

本明細書では、実質的に純粋(な)とは、当業者がそのような純度を評価するのに利用する、薄層クロマトグラフィー(TLC)法、ゲル電気泳動法および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法などの標準的な分析方法により決定されるような容易に検出できる不純物がないように十分に均質であること、またはさらなる精製により物質の酵素活性および生物活性などの物理的および化学的特性を検出可能な程度に変化させることができないほど実質的に純粋であることを指す。実質的に化学的に純粋な化合物をもたらすような化合物の精製方法が当業者に知られている。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体または異性体の混合物とすることができる。そのような場合には、さらなる精製により、化合物の比活性度が高くなるかもしれない。

30

【0147】

本明細書では、標的細胞とは、sHASEGPをインビボで発現する細胞を指す。

【0148】

本明細書では、試験物質(または試験化合物)とは、化学的に定義された化合物(例えば、有機分子、無機分子、有機/無機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、多糖類、糖類、または糖タンパク質などのこれらの分子同士のハイブリッドなど)または化合物の混合物(例えば、試験化合物のライブラリー、天然抽出物または培養上清など)であって、sHASEGP、特にヒアルロニダーゼドメインまたは活性に十分なその一部分を含む一本鎖型に対するその効果が本明細書に示されるアッセイなどのインビトロの方法により決定されるようなものを指す。

40

【0149】

本明細書では、治療薬、治療計画、放射線防護物質または化学療法薬という用語は、ワクチンを含めて、当業者に知られている従来の薬物および薬物療法を指す。放射線治療薬が当技術分野においてよく知られている。

【0150】

本明細書では、治療とは、病状、障害または疾患の症状が改善されるかまたは別の方法で有益に変えられる任意の方法を指す。

【0151】

治療には同様に、本明細書の組成物の任意の製薬学的用途が含まれる。

【0152】

50

本明細書では、ベクター(またはプラスミド)とは、異種の核酸を細胞に発現またはその複製を目的として導入するのに使用される独立した構成単位を指す。ベクターは通常、エピソームのままであるが、ゲノムの染色体への遺伝子またはその一部分の組込みをもたらすように設計することができる。同様に企図されるのは、酵母人工染色体および哺乳類人工染色体などの人工染色体であるベクターである。そのような媒体の選択および使用は当業者によく知られている。発現ベクターには、作動可能に連結されたDNA断片の発現をもたらすことができる、プロモーター領域などの調節配列と作動可能に連結されたDNAを発現できるベクターが含まれる。したがって、発現ベクターとは、適当な宿主細胞に導入すると、クローニングされたDNAの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは他のベクターなどの組換えDNAまたはRNA構築物を指す。適当な発現ベクターは、
10

【0153】

本明細書では、タンパク質結合配列とは、他のタンパク質もしくはペプチド配列に一般に、一連のタンパク質もしくはペプチド配列にまたは特定のタンパク質もしくはペプチド配列に特異的に結合できるタンパク質またはペプチド配列を指す。

【0154】

本明細書では、エピトープタグとは、エピトープタグが付加されたタンパク質またはペプチドのその後の生化学的および免疫学的分析を容易とするためのエピトープに相当する
20

アミノ酸残基の短いストレッチを指す。エピトープタグの付加は、適当な発現ベクターにおいてタンパク質をコードする配列にエピトープタグの配列を加えることにより達成される。エピトープタグが付加されたタンパク質は、そのタグに対して産生された極めて特異性の高い抗体を用いてアフィニティー精製することができる。

【0155】

本明細書では、金属結合配列とは、金属イオンに一般に、一連の金属イオンにまたは特定の金属イオンに特異的に結合できるタンパク質またはペプチド配列を指す。

【0156】

本明細書では、組み合わせとは、二つまたはそれ以上のものの間の任意の関連性を指す。
30

【0157】

本明細書では、組成物とは、任意の混合物を指す。これは溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水溶液、非水溶液またはその任意の組み合わせとすることができる。

【0158】

本明細書では、流体とは、流動できる任意の組成物を指す。流体にはしたがって、半固形物、ペースト、溶液、水溶性混合物、ゲル、ローション、クリームおよび他のそのような組成物の形態で存在する組成物が包含される。

【0159】

本明細書では、細胞抽出物とは、溶解されたまたは破壊された細胞から調製される調製物または分画を指す。
40

【0160】

本明細書では、薬剤が、タンパク質のみのまたはその関連する基質、結合パートナーなどとの会合に参与する特定配列を考慮することなく無作為に選択される場合、薬剤は無作為に選択されると言われる。無作為に選択される薬剤の例は、化学ライブラリーもしくはペプチドコンビナトリアルライブラリー、または生物の増殖肉汁培地もしくは条件培地の使用である。

【0161】

本明細書では、薬剤が、標的部位の配列および/または薬剤の作用との関連でその高次構造を考慮する無作為ではない基準で選択される場合、薬剤は合理的に選択されるまたは設計されると言われる。実施例に記述されるように、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 4を
50

有する糖タンパク質のヒアルロニダーゼおよび(触媒)部位に対する結合部位が提唱される。薬剤はこれらの部位を構成するペプチド配列を利用することにより、合理的に選択されるかまたは合理的に設計されることができる。例えば、合理的に選択されるペプチド薬剤は、そのアミノ酸配列がATPまたはカルモジュリン結合部位もしくはドメインに同一であるペプチドとすることができる。

【0162】

オリゴ糖は、還元末端の糖類が実際に還元糖であるか否かを問わず、還元末端と非還元末端とを有すると考えられる。一般的に認められた命名法にしたがって、オリゴ糖は、非還元末端を左側におよび還元末端を右側にして本明細書に描かれる。本明細書で記述される全てのオリゴ糖は、非還元糖類に対する名称または略号(例えば、Gal)を記述し、その後

10

【0163】

後にグリコシド結合の立体配置(または)、環結合、結合に関与する還元糖類の環位置、次いで還元糖類の名称または略号(例えば、GlcNAc)が続く。二つの糖の間の結合は、例えば、2,3,2 3、または(2,3)として表すことができる。各糖類はピラノースである。

本明細書では、N-結合糖部分とは、Asn残基のアミド窒素を介してsHASEGPに付着されるオリゴ糖を指す。N-結合オリゴ糖はいくつかの主要型(オリゴマンノース型、複合型、ハイブリッド型、硫酸型)に分類され、これらの全てが-Asn-Xaa-Thr/Ser-配列(式中XaaはProではない)に含まれるAsn残基のアミド窒素を介して付着されるコアの(Man) 3-GlcNAc-GlcNAc-を有する。N-結合部位は、配列決定の間の「ブランク」サイクルの出現により間接的に割り当てられることが多い。積極的な同定は、グリコシル化AsnをAspに変換するPNGase Fによるオリゴ糖の遊離後に行うことができる。PNGase Fによる遊離後、N-結合オリゴ糖をBio-Gel P-6クロマトグラフィーを用いて精製し、そのオリゴ糖のプールを分取用の高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8)にかけることができる。ある種のオリゴ糖異性体は、HPAECを用いて分離することができる。フコース残基はHPAECクロマトグラムで溶出位置を早くに移動させることになるが、付加的なシアル酸残基は保持時間を増大させることになる。オリゴ糖の構造が知られている糖タンパク質(例えば、ウシフェツイン、 α -1酸性糖タンパク質、オポアルブミン、RNase B、トランスフェリン)を同時に処理することで、オリゴ糖のピークの割り当てを容易にすることができる。回収されるオリゴ糖は、NMR分光法により割り当てられたアノマー配置(Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230)との、組成およびメチル化連鎖分析(Waeghe et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304.)の組み合わせにより特徴付けることができる。

20

30

【0164】

または、オリゴ糖は蛍光標識糖鎖電気泳動(FACE)法により同定することができる(Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281)。

【0165】

本明細書では「シアル酸」という用語は、9炭素のカルボキシル化糖類のファミリーのうちいずれかのメンバーを指す。シアル酸ファミリーのうち最も一般的なメンバーは、N-アセチルノイラミン酸(2-ケト-5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノソ-1-オン酸 (2-keto-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonulopyranos-1-onic acid) (Neu5Ac、NeuAc、またはNANAと略記されることが多い))である。ファミリーの第二のメンバーは、NeuAcのN-アセチル基がヒドロキシル化されているN-グリコリル-ノイラミン酸(Neu5GcまたはNeuGc)である。第三のシアル酸ファミリーのメンバーは、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸(KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 21811-21819)である。同様に含まれるのは、9-O-ラクチル-Neu5Acのような9-O-C₁~C₆アシル-Neu5Ac、または9-O-アセチル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Acおよび9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどの9-置換シアル酸である。シアル酸ファミリーの総説については、例えば、Varki (1992) Glycobiology 2: 25-40 ; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, N.Y. (1992))を参照されたい。シアル化(sialati

40

50

on)手順におけるシアル酸化合物の合成および用途は、1992年10月1日付で公開された国際出願WO 92/16640に開示されている。

【0166】

本明細書では、PNGaseとは、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム(*Flavobacterium meningoseptum*)のペプチド-N-グリコシダーゼFなどのアスパラギンペプチド特異的N-グリコシダーゼFを指す。PNGase酵素は、O-結合オリゴ糖ではなくN-結合オリゴ糖に対するその特異性により特徴付けられる。PNGase効力の特徴付けは、SDS PAGE電気泳動法、または蛍光標識糖鎖電気泳動法の両方で定義することができる。

【0167】

本明細書では、実質的に終結したシアル化とは、末端の糖としてシアル酸残基で終結しているN-結合オリゴ糖を指す。末端のシアル酸は、ノイラミニダーゼによる処理後に放出される糖質のFACE分析により同定することができる。

10

【0168】

血液中の糖タンパク質の循環上の寿命は、そのN-結合糖質群の組成および構造に大きく依存している。この事実は、非経口的に投与することを意図した治療用糖タンパク質に直接関連するものである。一般に、糖タンパク質の循環上の最大半減期には、そのN-結合糖質群が配列NeuAc-Gal-GlcNAcで終結することが必要になる。末端シアル酸(NeuAc)がない場合には、糖タンパク質は、内在するN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)またはガラクトース(Gal)残基の認識を含む機構により血液から速やかに除去されてしまう(Goochee et al. (1991) *Biol/Technology* 9: 1347-1355)。このため、治療用糖タンパク質のN-結合糖質群に対して末端シアル酸の存在を確実にすることは、その商業的開発には重視すべき事柄である。

20

【0169】

循環している糖タンパク質は、末端シアル酸残基を除去可能なシアリダーゼ(またはノイラミニダーゼ)にさらされる。通常は、シアル酸の除去によりガラクトース残基があらわとなり、肝細胞のガラクトース特異的受容体がこれらの残基を認識して結合する(Ashwell and Harford (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51:531に概説されている)。肝臓には同様に、血液循環からの糖タンパク質の除去を媒介する他の糖特異的な受容体が含まれる。そのような受容体の特異性には同様に、N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコースおよびホスホマンノースが含まれる。肝細胞のガラクトース受容体により除去される糖タンパク質は、実質的な分解を受けて、それから胆汁に入る；クッパー細胞のマンノース受容体により除去される糖タンパク質は、細網内皮系に入る(Ashwell and Harford (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51:53に概説されている)。

30

【0170】

本明細書では、中性活性とは、インピトロにおいて150mM未満の塩および50mM未満の緩衝強度の条件下でpH5~8にてグリコサミノグリカン基質に対して触媒活性を有するsHASEGP糖タンパク質を指す。

【0171】

本明細書では、安定化溶液とは、室温で30日間の保存後にその最初の活性の60%よりも多くを保持するsHASEGPを指す。

40

【0172】

本明細書では特別の定めのない限り、単位は濁度減少単位(TRU)で表される。1 TRUはヒアルロン酸の酸性化溶液の濁度を減少させるのに必要とされるヒアルロニダーゼ活性の量と定義され、アメリカ薬局方(U.S.P.)/国民医薬品集(NF XIII)の単位(NFU)に等価である。本明細書で記述されるELISA様酵素アッセイは、U.S.P.を通じて標準化されているヒアルロニダーゼの標品(例えば、USPまたはWHO標準物質)の標準曲線を通してTRU、NFU、およびU.S.P.単位に関連付けることができる。したがって、ELISA様酵素アッセイにより決定される酵素活性は、濁度試験(Dorfman et al., 1948, *J. Biol. Chem.* 172:367)を利用して酵素活性が実際に測定されるわけではないので、実際には相対的なTRUである。

【0173】

50

本明細書では、効力とは、インビトロで基質を分解するのに必要とされるsHASEGPタンパク質の濁度減少単位または相対的な濁度減少単位に基づく量により定義される。

【0174】

本明細書では、特異活性とはタンパク質1mgあたりの活性の単位を指す。sHASEGPタンパク質の量は280nmのsHASEGPタンパク質の溶液の吸収により、約1.7のモル吸光係数を考えて $M^{-1} cm^{-1}$ の単位で定義される。

【0175】

ポリエチレングリコール(PEG)は、生体材料、生命工学および医学で広く使用されている。これは主にPEGが、生体適合性で無毒性であり、非免疫原性で水溶性のポリマーであるためである(Zhao and Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997)。薬物送達
10
の分野では、PEG誘導体は、免疫原性、タンパク質分解および腎臓クリアランスを低下させるためにならびに溶解性を高めるためにタンパク質との共有結合(すなわち「PEG(ペグ化)」)で広く使用されている(Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995)。同様に、PEGは、溶解性を高めるために、毒性を低下させるためにおよび生体内分布を変化させるために低分子量の、相対的に疎水性の薬物に付着されている。通常、PEG化された薬物は溶液として注射される。

【0176】

密接な関係がある用途は、薬物送達に用いるための架橋された分解可能なPEGのネットワークまたは製剤の合成である。これは分解可能な、溶解性の薬物担体の設計に使われる
20
同じ化学反応の多くを同様に分解可能なゲルの設計に使用することもできるからである(Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993)。高分子間の複合体は二種の相補性重合体の溶液を混合することにより形成できることも知られている。そのような複合体は一般に、含有される重合体間の静電相互作用(ポリアニオン-ポリカチオン)および/もしくは水素結合(ポリ酸-ポリ塩基)により、ならびに/または水性環境中の重合体間の疎水性相互作用により安定化される(Krupers et al., Eur. Polym J. 32:785-790, 1996)。例えば、適当な条件下でポリアクリル酸(PAAc)およびポリエチレンオキシド(PEO)の溶液を混合することで、主に水素結合に基づいた複合体の形成が起こる。これらの複合体の生理的条件下での解離が遊離薬物(すなわち、ペグ化されていない)の送達に利用されている。さらに、相補性重合体の複合体が同種重合体および共重合体の両方から形成されている。

【0177】

一つの側面において、ポリエチレングリコールは、約3kDから約50kD、および好ましくは約5kDから約30kDに及ぶ分子量を有する。薬物とのPEGの共有結合(「PEG化」として知られる)は、既知の化学合成技術により達成することができる。例えば、本発明の一つの側面において、タンパク質のPEG化は、適当な反応条件の下でNHS-活性化PEGをタンパク質と反応させることにより達成することができる。

【0178】

PEG化について多数の反応が報告されているが、最も広く適用できるものは、方向性を与え、温和な反応条件を利用し、および有害な触媒または副産物を除去するための大幅な後処理を必要としない。例えば、モノメトキシPEG(mPEG)には反応性の末端ヒドロキシル
40
が一つしかなく、したがってその使用により、生じるPEG-タンパク質産物の混合物の不均一性がいくらか抑えられる。末端のメトキシ基に対向する重合体の末端にあるヒドロキシル基の活性化が一般に、効果的なタンパク質のPEG化を達成するのに必要であり、その目的は誘導体化されたPEGに求核攻撃をいっそう受けやすくさせることである。攻撃する求核試薬は通常、リシル残基の ϵ -アミノ基であるが、しかし局部的条件が好ましい場合には他のアミン(例えば、N末端 ϵ -アミノまたはヒスチジンの環アミン)が反応することもできる。指向性の高い結合は、単一のリジンまたはシステインを含有するタンパク質で可能である。後者の残基は、チオール特異的修飾のためのPEG-マレイミドにより標的化することができる。または、PEGヒドラジドを過ヨウ素酸酸化sHASEGPと反応させて、 $NaCNBH_3$ の存在下で還元することができる。より具体的には、PEG化されたCMP糖を適当なグリコシルトランスフェラーゼの存在下でsHASEGPと反応させることができる。技術の一つに、多数
50

の重合体分子を問題のポリペプチドにカップリングさせる「PEG化」技術がある。この技術を利用すれば、免疫系は抗体の形成に關与するポリペプチドの表面上のエピトープを認識するのが困難となり、したがって免疫反応を低下させられる。特定の生理的効果を与えるために人体の循環系に直接導入されるポリペプチド(すなわち、医薬品)の場合、通常起こり得る免疫反応はIgGおよび/またはIgM反応であるが、いっぽう呼吸器系を通じて吸入されるポリペプチド(すなわち、産業上のポリペプチド)は場合によってはIgE反応(すなわち、アレルギー反応)を引き起こすかもしれない。免疫反応の低下を説明する見解の一つは、重合体分子が抗体形成をもたらす免疫反応に關与するポリペプチドの表面上のエピトープを遮へいするということである。別の見解または少なくとも部分的な要因は、抱合体が重くなるほど、それだけ免疫反応の低下が得られるということである。

10

【0179】

ポリペプチドにカップリングされる重合体分子は、ポリオール(すなわち、ポリ-OH)、ポリアミン(すなわち、ポリ-NH₂)およびポリカルボキシル酸(すなわち、ポリ-COOH)などの天然および合成同種重合体、ならびにさらに異種重合体、すなわち、一つまたは複数の異なるカップリング基、例えば、ヒドロキシル基およびアミン基を含む重合体を含めて、本発明により定義されるような分子量を有する任意の適当な重合体分子とすることができる。

【0180】

適当な重合体分子の例には、ポリプロピレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(mPEG)およびポリプロピレングリコールを含む、ポリアルキレングリコール(PAG)などのポリアルキレンオキシド(PAO)、PEG-グリシジルエーテル(Epoxy-PEG)、PEG-オキシカルボニルイミダゾール(CDI-PEG)分枝ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリ-D,L-アミノ酸、ポリエチレン-マレイン酸無水物共重合体、ポリスチレン-マレイン酸無水物共重合体、カルボキシメチル-デキストランを含むデキストラン、ヘパリン、相同アルブミン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース(ethylcellulosia)、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロースを含むセルロース、キトサン加水分解物、ヒドロキシエチルスターチおよびヒドロキシプロピルスターチなどのデンプン、グリコーゲン、アガロースおよびその誘導体、グアールガム、プルラン、イヌリン、キサンタンガム、カラギナン、ペクチン、アルギン酸加水分解物ならびに生体高分子からなる群より選択される重合体分子が含まれる。

20

30

【0181】

好ましい重合体分子は、酵素の表面上の付着基とのその共有結合に対し比較的単純な化学反応をさらに必要とする(m)ポリエチレングリコール(mPEG)などの無毒性の重合体分子である。

【0182】

PEGおよび特にmPEGなどのポリエチレンオキシドのような、一般的に見られるポリアルキレンオキシド(PAO)は、好ましい重合体分子である。これらの重合体分子には、デキストラン、プルランおよび同様のものなどの多糖類と比較して、架橋結合できる(このことは望ましくない)反応基が少ないためである。

40

【0183】

B. sHASEGPの組織発現プロファイル

ヒトsHASEGPは、以前には精巢特異的であると考えられていたが、RT-PCRなどの高感度の技術を利用すると、ヒトでは複数の組織で発現している。sHASEGP転写産物は、髄質(脳)、毛細血管内皮細胞、前立腺、乳房、網膜、プールヒトメラニン形成細胞、胎児心臓、および妊娠子宮で見出される。sHASEGPは胚細胞腫瘍でも発現される。精巢以外の組織でのレベルを検出には、RT-PCRに基づくsHASEGP転写産物の検出がおおむね必要になる。

【0184】

C. sHASEGP酵素活性のアッセイ

ヒアルロニダーゼ活性の濁度マイクロタイターアッセイ

50

ヒアルロニダーゼ活性は、酸性化血清溶液中での改変型濁度アッセイにより検出することができる。必要とされる試薬は次の通りである：

UV 滅菌 2X 脱イオン水または洗淨用滅菌水	Braun	R5000-01	
Hylumed Medical – ヒアルロン酸ナトリウム、 高分子量 HA	Genzyme Advanced Biomaterials	4876	
ヒアルロニダーゼ標準品	USP	31200	10
酢酸カリウム, 顆粒状, USP, ACS	JTBaker	2914-01	
氷酢酸, 99+ %	Sigma	A-6283	
一塩基性リン酸ナトリウム一水和物, USP 顆粒状	Mallinkrodt	7774	
二塩基性リン酸ナトリウム, 無水物, USP	Mallinkrodt	7771	
塩化ナトリウム, 結晶, GR, ACS	EMScience	SX0420-5	
ゼラチン酵素加水分解物	Sigma	G-0262	20
ウマ血清, Donor Herd, 細胞培養試験 済み, ハイブリドーマ培養試験済み, USA Origin	Sigma	H-1270	
ヒト血清アルブミン 20 %	Griffols		
塩酸, ACS 試薬	Sigma	H-7020	
塩化カルシウム二水和物, 顆粒状, USP, -FCC	JTBaker	1336-01	

【 0 1 8 5 】

以下の試薬を調製する：酢酸緩衝溶液-酢酸カリウム14.0gおよび氷酢酸25.0mLを水で1000mLに調製する。リン酸緩衝溶液-一塩基性リン酸ナトリウム2.5g、二塩基性リン酸ナトリウム無水物1.0g、および塩化ナトリウム8.2gを水で1000mLに調製する。酵素希釈ストック溶液-リン酸緩衝溶液500mLを水500mLと混合。酵素希釈作業溶液-加水分解したゼラチン33mgを酵素希釈ストック溶液50mLに加える-使用の2時間以内に調製。試料安定化緩衝溶液(「SSB」溶液)-20%ヒト血清アルブミン溶液125 μ Lおよび1M塩化カルシウム溶液50 μ Lを酵素希釈作業溶液50mLに加えて、十分に混合する。血清ストック溶液-ウマ血清1容量を酢酸緩衝溶液9容量で希釈。4N塩酸でpH3.1に調整して、この溶液を室温で18~24時間静置させる。溶液を4 で保存して、30日以内に使用する。血清作業溶液-血清ストック溶液10mLを酢酸緩衝溶液30mLに加えて、室温とする。ヒアルロン酸ストック溶液-ヒアルロン酸ナトリウムを水で濃度5.0mg/mLとする。ヒアルロン酸作業溶液-ヒアルロン酸ストック溶液0.75mLをリン酸緩衝溶液4.25mLに加える。標準物質ストック溶液-USP標準品ヒアルロニダーゼの1容器に水を加えて濃度1000単位/mLとし、50 μ L量に分注して、-20 で保存する。標準物質作業溶液-標準物質ストック溶液40 μ Lを冷えた酵素希釈作業溶液960 μ Lに加えて、既知濃度40単位/mLを有する溶液を得る。これはアッセイで使用する直前に調製する。

【 0 1 8 6 】

酵素試料は全て、以下の指針に従い「低タンパク質結合性」96ウェルプレート中で希釈する。

【 0 1 8 7 】

10

20

30

40

50

a) このアッセイの最大感度の範囲は10~30単位/mLである。範囲内となる結果が得られるようにアッセイを繰り返さなければならない回数を最小限にするため、最初に試料に対し適当な総数の単位/mLを決定し、その後、終濃度が約20単位/mLとなるように(整数)希釈度を選択する。

【0188】

b) アッセイを行うのに必要とされる試料最少容量は次の通りである：FPLC分画=50 µL、組織培養上清=1mL、精製済み/濃縮済み/最終段階の材料=10 µL。

【0189】

c) 段階希釈による試料の場合、「低タンパク質結合性」96ウェルプレート中で10倍希釈を、「SSB」溶液360 µLおよび試料40 µLを各ウェル中にピペットで取ることにより三重で行う。

10

【0190】

USP標準物質の調製の場合、次のように「低タンパク質結合性」96ウェルプレート中にUSP標準曲線(用物質)を調製する

USP 標準曲線:

<u>ウェル:</u>	<u>標準:</u>	<u>酵素 希釈溶液 (µL):</u>	<u>標準物質 作業溶液 (µL):</u>	<u>終濃度 (単位/mL):</u>
A1-A3	St01	0	100	40
B1-B3	St02	20	80	32
C1-C3	St03	40	60	24
D1-D3	St04	60	40	16
E1-E3	St05	80	20	8
F1-F3	St06	90	10	4
G1-G3	St07	100	0	0

20

【0191】

列1~3のヒアルロン酸対照の調製の場合、「平底」96ウェルプレート中にH.A.対照を次のように調製する

【0192】

H.A. 対照:

<u>ウェル:</u>	<u>対照:</u>	<u>ヒアルロン酸 作業溶液 (µL):</u>	<u>酵素希釈 作業溶液 (µL):</u>
H1-H3	Co01	0	60

30

【0193】

反応プレート：50 µLの8チャンネルトランスファーピペットを用いて、ヒアルロン酸作業溶液30 µL/ウェルを「平底」96ウェルプレート中にピペットで取る。ウェルH1~H3はそのままにしておく。酵素希釈作業溶液60 µL/ウェルをHA対照と同じプレートのウェルH1~H3中にピペットで取る。

40

【0194】

血清作業溶液：血清作業溶液40mLを運搬器(transfer basin)に分注し、次にヒートブロックに入れる。

【0195】

前加熱段階：両方のプレートを調製したら、希釈した試料、標準物質、対照を含む低タンパク質結合性96ウェルプレートおよびヒアルロン酸作業溶液を含む平底96ウェルプレートをヒートブロック上に置いて、それらを37 °Cで5分間温めておく。

【0196】

反応は基質に酵素を、つまり5~50 µL用の8チャンネルピペットを用いて96ウェル平底プレート(基質を含む)の列#1のウェルの全てに酵素プレートから30 µLを添加して開始す

50

る。酵素/基質反応混合液を5回吸引する(完全な試料の混合を確実にするために最初の15秒間、そのトランスファーピペットを使って溶液を吸ったり吐いたりする)。酵素および基質を混合後、チップを取り外して、次列用に、新しいチップのセットをトランスファーピペッターに装着する。タイマーを再始動させて、時間(t)=0:30で、この工程を列2に対して繰り返す。次の30秒間(t)=1:00で、今度は列3に対して工程を繰り返す。この工程を、ウェルの全てに酵素および基質の両方が含まれるまで30秒毎に、プレートを手端から右端まで移動しながら繰り返す。

【 0 1 9 7 】

反応の停止: タイマーが6分(t)=6:00に達したら、血清作業溶液240 μ Lを各ウェルの中に、つまり50~300 μ L用の8チャンネルトランスファーピペットを用い、隣接する50mL試薬容器から96ウェル平底プレートの列1の中にピペットで入れる。この混合液を完全な混合を確実にするために最初の10秒間3回吸引する(そのトランスファーピペッターを使って溶液を吸ったり吐いたりする)。この工程を30秒毎に繰り返し、列1から12まで続けて行う。最終列(列12)の完了後、反応プレートをヒートブロックから取り出して、プレートを640nMのプレートリーダーのリードトレイ上に置く。線形曲線フィットは試験試料の外挿を可能とする標準曲線から行う。

【 0 1 9 8 】

ヒアルロニダーゼの代替的アッセイ

ビオチン化ヒアルロナン・マイクロタイターアッセイ

ヒアルロナンのグルクロン酸残基の遊離カルボキシル基をビオチン-ヒドラジド(Pierce)、スルホNHS(Pierce)および1-エチルジメチルアミノプロピル-カルボジイミド(Sigma)による1段階反応でビオチン化する。このビオチン化されたHA基質を第2反応で96ウェルマイクロタイタープレートに共有結合させる。酵素反応の完了時に、残る基質を標準的なELISAプレートリーダーで測定できるアビジン-ペルオキシダーゼ反応により検出する。基質はマイクロタイタープレートに共有結合されるので、ビオチン化基質のpH依存的な置換など的人為的結果は起こらない。その感度により、アッセイ間のばらつき10%未満で培養細胞および生体試料のヒアルロニダーゼ活性を迅速に測定できる。

【 0 1 9 9 】

ヒアルロニダーゼの特異活性は濁度減少単位(TRU)で表される。1TRUはヒアルロン酸の酸性化溶液の濁度を減少させるのに必要とされるヒアルロニダーゼ活性の量と定義され、アメリカ薬局方(U.S.P.)/国民医薬品集(NF XIII)の単位(NFU)に等価である。精製に利用されるELISA様酵素アッセイは、U.S.P.を通じて標準化されているヒアルロニダーゼの標品(例えば、USP)の標準曲線を通してTRU、NFU、およびU.S.P.単位に関連付けられる。したがって、ELISA様酵素アッセイにより決定される酵素活性は、濁度試験(Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172:367)を利用して酵素活性が実際に測定されるわけではないので、実際には相対的なTRUである。

【 0 2 0 0 】

ヒアルロニダーゼアッセイの多くは、新たな還元N-アセチルアミノ基の生成(Bonner and Cantey, Clin. Chim. Acta 13:746-752, 1966)、または粘度の消失(De Saiegui et al., Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967)もしくは濁度の消失(Dorfman and Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948)の測定に基づいている。精製された基質を使えば、これらの方法は全てエンド型グルコサミド(endoglucosamidic)活性の有無の決定に十分である。

【 0 2 0 1 】

実質的に精製されたグリコサミノグリカン基質を同様にゲルシフトアッセイで使用することができる。グリコサミノグリカンを組換えsHASEGPと混合して、ゲル内での基質の移動度の変化をもたらしエンドグルコシダーゼ活性について試験する。コンドロイチン-4および6硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸は、Sigma Chemicalから得ることができる。ヒト臍帯ヒアルロナンは、ICNから得ることができる。各試験基質をpH3.5~7.5の緩衝液で0.1mg/mlに希釈する。10 μ lの精製sHASEGP試料またはsHASEGPを発現する細胞からの同

10

20

30

40

50

等の条件培地を所望の緩衝液中の試験基質90 μ Lと混合して、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートする。インキュベーション後、試料を試料用緩衝液(Tris EDTA pH8.0, プロモフェノールブルーおよびグリセロール)で中和し、続けて電気泳動を行う。グリコサミノグリカンは、ゲルを0.5%アルシアンブルーの3%氷酢酸溶液中で一晩染色し、続けて7%氷酢酸溶液中で脱染することにより検出する。分解を酵素有りおよび無しでの基質の移動度の比較により決定する。

【0202】

ヒアルロニダーゼ活性は同様に、基質ゲル酵素電気泳動法(Guentenhoner et al., 1992, Matrix 388-396)により決定することができる。このアッセイでは、試料をヒアルロン酸含有SDS-PAGEゲルに添加して、試料中のタンパク質を電気泳動により分離する。次いで、ゲルを酵素アッセイ緩衝液中でインキュベートし、その後染色してゲル中のヒアルロン酸を検出する。ヒアルロニダーゼ活性は、基質ゲル中の透明帯として可視化される。

【0203】

D. sHASEGPポリペプチド遺伝子の同定および単離

sHASEGPポリペプチド遺伝子および/またはそのドメインは、当技術分野においてよく知られているDNA単離のための方法により得ることができる。所望の遺伝子をコードする核酸を同定するために当業者に知られている任意の方法を利用することができる。当技術分野において利用できる任意の方法を使って、sHASEGPポリペプチドをコードする完全長の(すなわち、全コード領域を含む)cDNAまたはゲノムDNAを得ることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使い、ゲノムまたはcDNAライブラリーにおいて、正常組織で発現される配列、例えば、sHASEGPポリペプチド(SEQ. No: 1および2)をコードする核酸を増幅させることができる。同定された配列の3'および5'末端の配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーをプライマーとして使用し、核酸試料(RNAまたはDNA、通常はcDNAライブラリー)から、適当な供給源(例えば、精巣、前立腺、乳房)からPCR配列により増幅させることができる。

【0204】

PCRは、例えば、Perkin-Elmer CetusサーマルサイクラーおよびTaqポリメラーゼ(Gene Amp)を使用することで行うことができる。増幅されるDNAには、任意の真核生物種からのRNAまたはcDNAもしくはゲノムDNAを含めることができる。一つにはPCR反応で用いる、いくつかの異なる縮重プライマーを合成することを選択できる。

【0205】

PCR反応の開始に使用されるハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変えること、既知のヌクレオチド配列と単離される核酸相同体との間のヌクレオチド配列の類似性の度合いを高くするかまたは低くすることにより核酸相同体を増幅すること(例えば、ヒト以外の種からsHASEGPポリペプチド配列を得ることまたはsHASEGPポリペプチドに相同性があるヒト配列を得ること)も可能である。異種間のハイブリダイゼーションの場合、低度のストリンジェンシーから中等度のストリンジェンシー条件が使われる。同種間のハイブリダイゼーションの場合、中ストリンジェントから高ストリンジェントな条件が使われる。その条件は実験的に決定することができる。

【0206】

同定されたsHASEGPポリペプチド配列の全部もしくは一部を含む核酸のまたはsHASEGPポリペプチド相同体の全部もしくは一部をコードする核酸の増幅の成功後、その断片を分子クローニングして配列決定することができる、および完全なcDNAまたはゲノムクローンを単離するためのプローブとして使用することができる。これにより、次に、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の解析、およびさらなる解析のためのそのタンパク質産物の産生が可能になる。ヌクレオチド配列が決定されれば、sHASEGPポリペプチド遺伝子のタンパク質産物をコードする読み取り枠は、読み取り枠を決定するために当技術分野においてよく知られている任意の方法により、例えば、ヌクレオチド配列解析のための公に利用できるコンピュータプログラムを用いて決定することができる。読み取り枠が定義されれば、読み取り枠によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を決定することは

10

20

30

40

50

日常の業務である。このようにして、sHASEGPポリペプチド遺伝子全体のヌクレオチド配列ならびにsHASEGPポリペプチドのタンパク質および類似体のアミノ酸配列を同定することができる。

【0207】

任意の真核細胞をsHASEGPポリペプチド遺伝子の分子クローニングのための核酸供給源とすることができるかもしれない。核酸は、脊椎動物、哺乳類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、トリ、ウマ、イヌ、ならびにさらなる霊長類の供給源、昆虫、植物および他の生物から単離することができる。DNAは、クローニングされたDNA(例えば、DNA「ライブラリー」)から当該技術分野において知られる標準的な手順により、化学合成により、cDNAクローニングにより、または所望の細胞から精製されたゲノムDNAもしくはその断片のクローニングにより得ることができる(例えば、

10

Sambrook et al.

1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. Ed., 1985, *DNA Cloning : A*

Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U. K. Vol. 1, 11

を参照されたい)。ゲノムDNAから得られるクローンには、コード領域に加えて調節およびイントロンDNA領域が含まれる；cDNAから得られるクローンには、エクソン配列しか含まれない。いかなる供給源であっても、遺伝子はその増殖を目的に適切なベクターにクローニングされる。

20

【0208】

ゲノムDNAからの遺伝子の分子クローニングでは、DNA断片をもたらし、そのうちのいくつかが所望の遺伝子をコードすることになる。

【0209】

DNAはさまざまな制限酵素により特定の部位で切断することができる。

【0210】

あるいは、一つにはDNAを断片化するためにマンガンの存在下でDNaseを使用することができる、またはDNAは、例えば、超音波処理により物理的に剪断することができる。次いで、直鎖状のDNA断片は、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動法ならびにカラムクロマトグラフィー法を含むがこれらに限定されない、標準的な方法によりサイズに応じて分離することができる。

30

【0211】

DNA断片がもたらされれば、所望の遺伝子を含む特定のDNA断片の同定は、さまざまな方法で達成することができる。

【0212】

例えば、sHASEGPポリペプチド(任意の種の)遺伝子的一部分(例えば、上記のように得られるPCR増幅産物または既知のヌクレオチド配列の一部分の配列を有するオリゴヌクレオチド)もしくはその特異的RNA、またはその断片を精製かつ標識することができ、生じたDNA断片を標識プローブとの核酸ハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることができる(Benton and Davis, *Science* 196: 180 (1977); Grunstein and Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 3961 (1975))。プローブに対し実質的に相同性があるDNA断片がハイブリダイズすることになる。制限酵素消化および断片サイズを既知の制限マップ(利用できる場合)により予測されるものと比較することによりまたはDNA配列解析およびsHASEGPポリペプチドの既知のヌクレオチド配列と比較することにより適当な断片を同定することも可能である。さらなる選択は、遺伝子の特性に基づいて行うことができる。または、遺伝子の存在は、その発現産物の物理的、化学的、または免疫学的特性に基づくアッセイにより検出することができる。例えば、cDNAクローン、または適当なmRNAをハイブリッド選択するDNAクローンは、例えば、類似のまたは同一の電気泳動、等電点電気泳動性、タンパク分解マップ、抗原特性、ヒアルロニダーゼ活性を有するタンパク質を産生

40

50

するものを選択することができる。抗sHASEGPポリペプチド抗体が利用可能である場合、そのタンパク質はELISA(酵素免疫測定法)型の手順で、sHASEGPポリペプチドを合成しているとみなされるクローンとの標識抗体の結合により同定することができる。

【0213】

sHASEGPポリペプチドのゲノムDNAを単離することに代わる方法は、以下に限定されることはないが、既知の配列から遺伝子配列を化学的に合成することまたはsHASEGPポリペプチドをコードするmRNAに対するcDNAを作製することを含む。

【0214】

例えば、sHASEGPポリペプチド遺伝子のcDNAクローニングに対しRNAを、そのタンパク質を発現している細胞から単離することができる。次いで、同定され且つ単離された核酸を適当なクローニングベクターに挿入することができる。当技術分野において知られる多数のベクター-宿主系を使用することができる。可能なベクターは、以下に限定されることはないが、プラスミドまたは改変ウイルスを含むが、但しベクター系は、使用する宿主細胞と適合していなければならない。そのようなベクターは、以下に限定されることはないが、誘導体などのバクテリオファージ、またはpBR322かpUCプラスミド誘導体もしくはBluescriptベクター(Stratagene, La Jolla, CA)などのプラスミドを含む。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニングベクターにDNA断片を連結することにより達成することができる。

10

【0215】

DNAを断片化するのに使用される相補的な制限部位がクローニングベクターに存在していない場合、DNA分子の末端を酵素的に修飾することができる。または、所望の任意の部位は、DNA末端にヌクレオチド配列(リンカー)を連結することによりもたらすことができる; これらの連結されるリンカーには、制限酵素認識配列をコードする特定の化学合成オリゴヌクレオチドを含むことができる。代替の方法として、切断されるベクターおよびsHASEGPポリペプチド遺伝子をホモポリマーテリングにより修飾することができる。

20

【0216】

組換え分子は、形質転換法、形質導入法、感染法、エレクトロポレーション法、カルシウム沈殿法および他の方法により宿主細胞に導入することができ、その結果、多コピーの遺伝子配列がもたらされる。

【0217】

特定の実施形態では、単離されたsHASEGPポリペプチドの遺伝子、cDNA、または合成されたDNA配列を組み込んだ組換えDNA分子による宿主細胞の形質転換により、複数コピーの遺伝子の産生が可能となる。

30

【0218】

したがって、遺伝子は、形質転換体を増殖させることにより、形質転換体から組換えDNA分子を単離することによりおよび、必要に応じて、単離された組換えDNAから挿入遺伝子を回収することにより大量に得ることができる。

【0219】

E. sHASEGPポリペプチドまたはそのヒアルロニダーゼドメインをコードする核酸を含むベクター、プラスミドおよび細胞ならびにsHASEGPポリペプチドベクターおよび細胞の発現

40

sHASEGPポリペプチドの一つまたは複数の組換え発現の場合、sHASEGPポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の全部または一部を含んだ核酸を適当な発現ベクター、すなわち、挿入されるタンパク質コード配列の転写および翻訳のために必要な要素を含んだベクターに挿入することができる。必要な転写および翻訳シグナルは同様に、sHASEGP遺伝子に対する野生型プロモーター、および/またはその隣接領域から与えることができる。

【0220】

同様に提供されるのは、可溶性の中性活性sHASEGPを産生できる発現系に導入することができる、sHASEGPをコードする核酸を含んだベクターである。

【0221】

そのベクターを含む細胞も提供される。細胞には、真核細胞および原核細胞、ならびに

50

その中で用いるのに適したベクターが含まれる。

【0222】

ベクターを含有する、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損チャイニーズハムスター卵巢細胞(DG44)を含む、真核細胞が提供される。適当な細胞には、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が含まれる。細胞を使用して、(a) コードされるsHASEGPポリペプチドまたはsHASEGPポリペプチドのヒアルロニダーゼドメインが前記の細胞により発現される条件の下で細胞を増殖させることにより、その後、(b) 発現されたヒアルロニダーゼドメインのタンパク質を回収することによりsHASEGPポリペプチドまたはそのヒアルロニダーゼドメインを産生させる。例示される実施形態では、ヒアルロニダーゼドメインは培地中に分泌される。

10

【0223】

一つの実施形態では、ヒアルロニダーゼ活性を有するおよびsHASEGPタンパク質の全部もしくはそのヒアルロニダーゼドメインのみの一部、またはその複数コピーを含む、ポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を含んだベクターが提供される。同様に提供されるのは、ヒアルロニダーゼドメインおよび完全長のsHASEGPタンパク質までの(完全長のsHASEGPタンパク質を含む)sHASEGPタンパク質のさらなる部分をコードするヌクレオチドの配列を含んだベクターであり、ならびにその複数コピーのものも同様に提供される。ベクターは、sHASEGPタンパク質もしくはそのヒアルロニダーゼドメインが細胞中に発現するようにまたはsHASEGPタンパク質が分泌タンパク質として発現するように選択することができる。または、ベクターは、コードされるタンパク質の分泌に必要なシグナルを含むことができる。ヒアルロニダーゼドメインを発現させる場合、その核酸をサッカロマイセス・セルビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) a接合因子のシグナル配列もしくはその一部分、または野生型のシグナル配列などの分泌シグナルをコードする核酸に連結する。

20

【0224】

可溶性の中性活性sHASEGPを産生させるために、N-結合グリコシル化を導入できる細胞が必要とされる。好ましい実施形態では、DG44などの、ジヒドロ葉酸還元酵素が欠損した哺乳類のチャイニーズハムスター卵巢細胞(DG44)に、SEQ ID NO 51に示される通りCMVなどの強力な哺乳類のプロモーター、sHASEGPをコードする核酸、続いて内部リボソーム侵入部位、マウスジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子およびSV40ポリアデニル化配列をコードするプラスミドをエレクトロポレーションする。次いで、そのような細胞をヒポキサンチンおよびチミジンの非存在下にて化学的に定義された培地中で培養し、続けてメトトレキサートの濃度を上げながらさらに遺伝子増幅させる。

30

【0225】

さまざまな宿主-ベクター系を利用して、タンパク質をコードする配列を発現させることができる。これらは、以下に限定されることはないが、ウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど)を感染させた哺乳類細胞系; ウイルス(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; 酵母ベクターを含んだ酵母などの微生物; またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換した細菌を含む。ベクターの発現要素は、その強度および特異度で変化する。使われる宿主-ベクター系に応じて、多くの適当な転写および翻訳要素のうちのいずれか一つを利用することができる。ここで留意すべきは、sHASEGP DNAの細菌発現により、それ自体が触媒的に活性なsHASEGPをもたらすことはないが、適当なグリコシル化機構と組み合わせれば、それ自体が人工的にグリコシル化され得ることである。

40

【0226】

核酸断片をベクターに挿入するのに当業者に知られている任意の方法を利用して、適当な転写/翻訳制御シグナルとタンパク質コード配列とを含んだキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組換えDNAおよび合成技術ならびにインビボ組換え体(遺伝子組換え)を挙げることができる。sHASEGPポリペプチド、またはそのドメイン、誘導體、断片もしくは相同体をコードする核酸配列の発現は、組換えDNA分子で形質転換した宿主でその遺伝子または断片が発現されるように第二

50

の核酸配列により調節することができる。例えば、タンパク質の発現は、当技術分野において知られる任意のプロモーター/エンハンサーにより制御することができる。特定の実施形態では、プロモーターはsHASEGPポリペプチドの遺伝子に対し野生型ではない。利用できるプロモーターは、以下に限定されることはないが、SV40初期プロモーター(Bernois t and Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター(Yamamoto et al., *Ce//22*: 787-797 (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼ・プロモーター(Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., *Nature* 296: 39-42 (1982)); -ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 75: 3727-3731 1978))またはTACプロモーター(Deboer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25 (1983); 同様に「Useful Proteins from Recombinant Bacteria」: in *Scientific American* 242: 79-94 (1980)を参照されたい)などの原核生物発現ベクター; オパリン合成酵素プロモーター(Herrar-Estrella et al., *Nature* 303: 209-213 (1984))またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Garder et al., *Nucleic Acids RES.* 9: 2871 (1981))、および光合成酵素リブローズニリン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrella et AL., *Nature* 310: 115-120 (1984))を含む植物発現プロモーター; Gal4プロモーターなどの酵母および他の真菌由来のプロモーター要素、アルコール脱水素酵素プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター、および組織特異性を示す且つ形質転換動物で使用されている以下の動物転写制御領域: 膵腺房細胞中で活性であるエラストラーゼI遺伝子制御領域(Swift Et AL., *Cell* 38: 639-646 (1984); Ornitz Et AL., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); Macdonald, *Hepatology* 7: 425-515 (1987)); 膵臓細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域(Hanahan et AL., *Nature* 315: 115-122 (1985))、リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et AL., *Cell* 38: 647-658 (1984); Adams et al., *Nature* 318: 533-538 (1985); Alexander et AL., *Mol. Cell Biol.* 7: 1436-1444 (1987))、睾丸、乳房、リンパ系およびマスト細胞中で活性であるマウス乳腫瘍ウイルス制御領域(Leder et AL., *CELL* 45: 485-495 (1986))、肝臓中で活性であるアルブミン遺伝子制御領域(PINCKERT et AL., *Genes and Devel.* 1: 268-276 (1987))、肝臓中で活性である -フェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et AL., *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-1648 (1985); Hammer et AL., *Science* 235: 53-58 1987))、肝臓中で活性である -1抗トリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., *Genes And Devel.* 1: 161-171 (1987))、骨髄性細胞中で活性である グロビン遺伝子制御領域(Mogram et al., *Nature* 315: 338-340 (1985); Kollias et AL., *CE//46*: 89-94 (1986))、脳のオリゴデンドロサイト細胞中で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al., *Cell* 48: 703-712 (1987))、骨格筋中で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, *Nature* 314: 283-286 (1985))、および視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞中で活性である性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., *Science* 234: 1372-1378 (1986))を含む。

【 0 2 2 7 】

特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチド、またはそのドメイン、断片、誘導体もしくは相合体をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーター、一つまたは複数の複製起点、および任意で、一つまたは複数の選択可能なマーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが使用される。

【 0 2 2 8 】

sHASEGP配列の効率的な翻訳には、特定の開始シグナルも必要になるかもしれない。これらのシグナルにはATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。sHASEGP、その開始コドンおよび上流配列が適当な発現ベクターに挿入される場合、さらなる翻訳制御シグナルは必要にはならないかもしれない。しかしながら、コード配列、またはその一部分しか挿入されない場合、ATG開始コドンを含む外来性の転写制御シグナルを付与する必要がある。さらに、開始コドンは、全挿入断片の転写を確実にするために正しい読み枠になればなら

ない。外来性の転写要素および開始コドンは、さまざまな起源のもの、つまり天然とも合成ともすることができる。発現の効率は、用いる細胞系に適したエンハンサーの包含により高めることができる(Scharf D et al (1994) *Results Probl Cell Differ* 20: 125-62; Bittner et al (1987) *Methods in Enzymol* 153:516-544)。

【0229】

さらに、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節するまたは所望の方法で発現タンパク質を修飾するその能力で選択することができる。ポリペプチドのそのような修飾は、以下に限定されることはないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化を含む。タンパク質の「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングが、正しい挿入、折り畳みおよび/または機能に重要となる場合もある。CHO (DG44、DXB1 1、CHO-K1)、HeLa、MDCK、293、WI38などのような異なる宿主細胞は、特異的な細胞機構およびそのような翻訳後の活性に特徴的な機構を有しており、挿入された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択することができる。

【0230】

組換えタンパク質の持続的な、高収率の産生の場合、安定発現が好ましい。例えば、sHASEGPを安定的に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点または内在性の発現要素および選択可能なマーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。ベクターの導入後、細胞を強化培地中で、選択培地に切り替える前に1~2日間増殖させることができる。選択可能なマーカーの目的は選択に対する耐性を与えることであり、その存在により、導入配列を成功裏に発現する細胞の増殖および回収が可能となる。安定的に形質転換された耐性の細胞群は、細胞型に適した組織培養技術を利用して増殖させることができる。

【0231】

多くの選択系のうちのいずれかを利用して、形質転換された細胞株を回収することができる。これらは、以下に限定されることはないが、TK-またはAPRT-細胞でそれぞれ使用できる、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Wigler M et al (1977) *Cell* 11:223-32)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy I et al (1980) *Cell* 22:817-23)遺伝子を含む。同様に、代謝拮抗剤、抗生剤または除草剤耐性を選択の基準として使用することができる; 例えば、メトトレキサートに対する耐性を与えるDHFR(Wigler M et al (1980) *Proc Natl Acad Sci* 77:3567-70); npt、これはアミノグリコシド抗生物質のネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与える(Colbere-Garapin F et al (1981) *J Mol Biol* 150:1-14)ならびにalsまたはpat、これらはそれぞれ、クロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を与える(Murry, 前掲)。さらなる選択可能な遺伝子が報告されている。例えば、trpB、これにより細胞はトリプトファンの代わりにインドールを利用することができる、またはhisD、これにより細胞はヒスチジンの代わりにヒスチノール(histinol)を利用することができる(Hartman S C and R C Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci* 85:8047-51)。最近では、可視的なマーカーの利用が人気を集めており、アントシアニン、グルクロニダーゼおよびその基質GUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンのようなマーカーが形質転換体を同定するのみならず、特定のベクター系による一過的または安定的なタンパク質発現の量を定量化するのにも広く利用されている(Rhodes C A et al (1995) *Methods Mol Biol* 55:121-31)。

【0232】

ポリヌクレオチド配列を含む形質転換体の同定

マーカー遺伝子の発現の有無は、対象とする遺伝子が同様に存在していることを示唆するが、活性なsHASEGPの存在および発現を確認すべきである。例えば、sHASEGPがマーカー遺伝子配列内に挿入されるならば、sHASEGPを含む組換え細胞は、マーカー遺伝子の機能の欠如により同定することができる。または、マーカー遺伝子は、単一プロモーターの制御下にあるsHASEGP配列とタンデムに配置することができる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現により、通常、タンデムなsHASEGPの発現が同様に示唆される。正

10

20

30

40

50

しくグリコシル化された中性活性sHASEGPの検出は、適当な条件の下で条件培地をsHASEGP酵素活性について試験することにより決定することができる。

【0233】

sHASEGPの精製

sHASEGPヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞は、細胞培養液からのコードされるタンパク質の発現および回収に適した条件の下で培養することができる。組換え細胞により産生されるタンパク質は、分泌されることが好ましいが、しかし使用されるベクターおよび/または配列に応じて細胞内に含まれる場合もある。当業者には明らかなように、sHASEGPを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を介したsHASEGPの直接的な分泌を容易とするシグナル配列をつけて設計することができる。他の組換え構築では、可溶性タンパク質の精製を容易とできるポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列にsHASEGPを連結することができる(Kroll D J et al (1993) DNA Cell Biol 12:441-53; 融合タンパク質を含む下方のベクターに関する考察を参照されたい)。

10

【0234】

sHASEGPは、タンパク質精製を容易とするために付加された一つまたは複数のさらなるポリペプチドドメインを有する組換えタンパク質として発現されてもよい。そのような精製を容易とするドメインは、以下に限定されることはないが、固定化した金属に対する精製を可能とするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレートペプチド、固定化した免疫グロブリンに対する精製を可能とするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長/アフィニティー精製系(Immunex社, Seattle Wash.)で利用されるドメインを含む。精製ドメインとsHASEGPとの間に第XA因子またはエンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego Calif.)などの切断可能なリンカー配列を含めることは、精製を容易とするのに有用である。そのような発現ベクターの一つは、sHASEGPを含む(compromising)融合タンパク質の発現を供与し、チオレドキシンおよびエンテロキナーゼ切断部位に先行する6ヒスチジン残基をコードする核酸を含む。ヒスチジン残基はIMIAC(Porath et al (1992) Protein Expression and Purification 3: 263-281に記述されているような固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)に対する精製を容易とするが、いっぽうエンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からケモカインを精製するための手段を供与する。

20

【0235】

組換え産生に加えて、sHASEGPの断片は、固相技術を利用した直接的ペプチド合成により産生することができる(Stewart et al (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W H Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85:2149-2154を参照されたい)。インビトロのタンパク質合成は、手動の方法を用いてまたは自動化により行うことができる。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer, Foster City Calif.)を用い、製造元により提供される使用説明書にしたがって達成することができる。sHASEGPのさまざまな断片を別々に化学合成し、化学的方法により結合して、完全長の分子を生成することができる。

30

【0236】

sHASEGPポリペプチドのコード配列、またはその一部分を含む発現ベクターは、例えば、コード部分を3種のPGEXベクター(グルタチオンS-トランスフェラーゼ発現ベクター(Smith and Johnson, Gene 7: 31-40 (1988))のそれぞれのEcoRI制限部位にサブクローニングすることにより作製される。これにより正しい読み枠の産物の発現が可能となる。sHASEGPポリペプチドのヒアルロニダーゼドメインの発現のための典型的なベクターおよび系には、よく知られている酵母(Pichia)用ベクター(例えば、Invitrogen, San Diego, CAから入手できる)、特にコードされるタンパク質の分泌用に設計されているものが含まれる。タンパク質は同様に、封入体内など、細胞質内に発現されることができる。典型的なベクターの一つが実施例に記述されている。

40

【0237】

大腸菌細胞の形質転換のためのプラスミドには、例えば、pET発現ベクター(U.S patent 4,952,496を参照されたい; Novagen, Madison, WIから入手できる; 同様に、この系につ

50

いて記述しているNovagen発行の文献を参照されたい)が含まれる。

【0238】

そのようなプラスミドには、T7 lacプロモーター、T7ターミネーター、誘導性の大腸菌 lacオペレーター、およびlacリプレッサー遺伝子を含むpET11a; T7プロモーター、T7ターミネーター、および大腸菌OMPT分泌シグナルを含むpET 12A-C; ならびにHisカラムによる精製に用いるHis-タグリーダー配列およびカラムに対する精製後の切断を可能とするトロンピン切断部位; T7-lacプロモーター領域およびT7ターミネーターを含むpET 15BおよびpET19B (Novagen, Madison, WI)が含まれる。

【0239】

ベクターをPichia細胞および細菌細胞(大腸菌など)のような、宿主細胞に導入し、タンパク質をその中で発現させる。典型的なPichia菌株には、例えば、GS 115が含まれる。典型的な細菌宿主には、LACUVプロモーターなどの、誘導性プロモーターに作動可能に連結されたT7 RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーが含まれる(U. S. Patent No. 4,952,496を参照されたい)。そのような宿主は、以下に限定されることはないが、溶原性大腸菌株BL21 (DE3)を含む。

【0240】

sHASEGPドメイン、誘導体および類似体は、当技術分野において知られるさまざまな方法により産生することができる。例えば、sHASEGPポリペプチド、またはそのドメイン、断片もしくは誘導体を発現する組換え細胞が同定されれば、個々の遺伝子産物を単離および分析することができる。これは、以下に限定されることはないが、産物の放射性標識に続けてゲル電気泳動による分析、免疫測定法、マーカーで標識した産物との架橋結合、およびタンパク質分解活性のアッセイを含む、タンパク質の物理的および/または機能的特性に基づくアッセイにより達成される。

【0241】

sHASEGPポリペプチドは、カラム(例えば、イオン交換、アフィニティー、ゲル排除、逆相高圧および高速タンパク質液体)クロマトグラフィー法、遠心分画法、溶解性分画法を含むがこれらに限定されない、当技術分野において知られる標準的な方法により、またはタンパク質の精製のために利用されるその他の任意の標準的な技術により(天然源または複合体もしくはタンパク質を発現する組換え宿主細胞から)単離および精製することができる。

【0242】

一つの実施形態では、sHASEGPは、1) 接線流れ透析ろ過、2) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる結合および溶出、3) フェニルセファロースクロマトグラフィーへの流入、4) フェニルボロネートクロマトグラフィーによる結合および溶出ならびに4) ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる結合および溶出により、HZ24を形質移入し且つメトトレキセートで増幅したDG44細胞の既知組成条件培地から均一にまで精製することができる。

【0243】

機能的特性は、当技術分野において知られている任意の適当なアッセイを利用して評価することができる。

【0244】

あるいは、sHASEGPポリペプチドまたはそのドメインもしくは誘導体が同定されれば、そのタンパク質のアミノ酸配列は、これをコードする遺伝子のヌクレオチド配列から推定することができる。結果的に、タンパク質またはそのドメインもしくは誘導体を当技術分野において知られている標準的な化学的方法により合成し(例えば、Hunkapiller et al, Nature 310: 105-111 (1984)を参照されたい)、その後インビトロでグリコシル化することができる。

【0245】

sHASEGPポリペプチド配列の操作は、タンパク質のレベルで行うことができる。同様に本明細書で企図されるのは、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、

10

20

30

40

50

ペグ化、既知の保護/封鎖基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞リガンドとの結合により、翻訳の間にまたは後に差別的に修飾される、sHASEGPポリペプチドタンパク質、そのドメイン、その誘導体もしくは類似体または断片である。

【0246】

多くの化学修飾のいずれも、以下に限定されることはないが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8、NABH₄による特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンおよび他のそのような作用物質の存在下での代謝合成を含む、既知の技術により行うことができる。

【0247】

さらに、sHASEGPポリペプチドのドメイン、類似体および誘導体は、化学的に合成することができる。例えば、所望のドメインを含むまたはインビトロで所望の活性を媒介する、sHASEGPポリペプチドの一部分に相当するペプチドは、ペプチド合成機を利用して合成することができる。

10

【0248】

さらに、必要に応じて、非古典的なアミノ酸または化学的なアミノ酸類似体をsHASEGPポリペプチド配列への置換または付加として導入することができる。非古典的なアミノ酸は、一般的なアミノ酸のD-異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、E-ABU、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン(propionico)酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、合成アミノ酸、例えば、 β -メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸類似体を含むがこれらに限定されることはない。さらに、アミノ酸はd(右旋性)またはl(左旋性)でありうる。

20

【0249】

天然産物の変異体である疑いがあるかまたは新種から単離される場合、その天然源、ならびにインビトロで発現されたものから、またはインビボもしくはインビトロの合成発現ベクターから単離されたsHASEGPポリペプチドのアミノ酸配列は、DNA配列の解析から、または単離されたタンパク質の直接配列決定により決定することができる。そのような解析は、手動式の配列決定によりまたは自動化アミノ酸配列決定装置の使用により行うことができる。

30

【0250】

修飾-sHASEGPポリペプチドおよびドメインのさまざまな修飾が本明細書で企図される。sHASEGPをコードする核酸分子は、当技術分野において知られる多くの戦略のうちのいずれかにより修飾することができる(Sambrook ET AL. (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)。配列を制限酵素により適当な部位で切断し、続けてさらに酵素的修飾を行うことができるが、必要に応じ、単離して、インビトロで連結することができる。sHASEGPのドメイン、誘導体または類似体をコードする遺伝子を産生する場合、修飾される遺伝子は、所望の活性がコードされている遺伝子領域において、翻訳停止シグナルにより中断されることのない、本来の翻訳読み枠を保持していることが確実に注意が払われなければならない。

40

【0251】

または、sHASEGPをコードする核酸分子は、翻訳、開始、および/もしくは終結配列を複製するおよび/もしくは破壊するために、またはコード領域に変異をもたらすおよび/もしくは新たな制限酵素部位を形成するか既存のものを破壊するために、インビトロ修飾をさらに容易とするために、インビトロまたはインビボで突然変異させることができる。同様に、本明細書で記述されるように、Cys残基の置換およびグリコシル化部位の除去または付加などの、一次配列の変化をともなう突然変異タンパク質が企図される; SEQ ID NO. 1のsHASEGPは、7箇所の潜在的なグリコシル化部位を有する。そのような変異は、以下に限

50

定されることはないが、化学的突然変異誘発法およびインビトロ部位特異的突然変異誘発法(Hutchinson et al., *J. Biol. Chem.* 253: 6551-6558 (1978)), TABEリンカー(Pharmacia)の使用を含む、当技術分野において知られる任意の突然変異誘発法により達成することができる。一つの実施形態では、例えば、sHASEGPポリペプチドまたはそのドメインは、蛍光標識を含むように修飾される。他の特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドはヘテロ二官能性試薬を有するように修飾され、そのようなヘテロ二官能性試薬を利用して、複合体のメンバーを架橋結合させることができる。

【0252】

さらに、sHASEGPポリペプチドのドメイン、類似体および誘導体は、化学的に合成することができる。例えば、所望のドメインを含むまたはインビトロで所望の活性を媒介する、sHASEGPの一部分に相当するペプチドは、ペプチド合成機を利用して合成することができる。さらに、必要に応じて、非古典的なアミノ酸または化学的なアミノ酸類似体をsHASEGPポリペプチド配列への置換または付加として導入することができる。非古典的なアミノ酸は、一般的なアミノ酸のD-異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、S-ABU、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン(propionoic)酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 γ -アラニン、フルオロアミノ酸、合成アミノ酸、例えば、ti-メチルアミノ酸、ca-メチルアミノ酸、na-メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸類似体を含むがこれらに限定されることはない。さらに、アミノ酸はd(右旋性)またはl(左旋性)とすることができる。

【0253】

F. N-結合糖部分を有する機能的に活性化グリコシル化sHASEGPの産出

正しくN-グリコシル化されたヒトsHASEGPが触媒的に安定なタンパク質を産生させるのに必要とされる。sHASEGPのN-結合グリコシル化は、さまざまな技術により達成することができる。sHASEGPのグリコシル化は、正しくN-結合グリコシル化できる真核生物由来の細胞にsHASEGPをコードする核酸を導入することによりまたは、所望のN-結合糖部分を導入できる無細胞抽出液もしくは精製酵素とsHASEGPポリペプチドを接触させることにより達成することができる。

【0254】

発現系の選択

真核細胞発現系は、異所的に発現したポリペプチド中にそれらが導入するグリコシル化の程度およびタイプが異なる。例えば、CHO細胞は、活性sHASEGPポリペプチドへのN-結合グリコシル化の導入で極めて効率的である。

【0255】

機能的なsHASEGP産物を産出するようにN-結合グリコシル化を導入するさらなる真核細胞発現系は、ヒトsHASEGP発現プラスミドをその細胞に導入することおよび中性活性を試験することにより調べることができる。正しいN-結合グリコシル化は、PNGaseにより遊離されたオリゴ糖のFACE分析により決定することができる。触媒的に活性化sHASEGPタンパク質のグリコシル化プロファイルが本明細書でさらに示される。グリコシル化の検証は同様に、前記の細胞由来のsHASEGPをPNGase-Fで処理することによりまたはsHASEGPをコードする核酸の導入後のツニカマイシン中でのその細胞の増殖により行うことができる。

【0256】

インビトロでのsHASEGPポリペプチドのN-グリコシル化。sHASEGPポリペプチドは、N-結合糖をイヌミクロゾーム膜などのsHASEGPポリペプチドに移行させることができる活性を含んだ無細胞抽出液とのsHASEGPポリペプチドの接触によりまたは商業的に利用可能な転写翻訳共役(Promega Madison WI)によりN-グリコシル化することができる。

【0257】

オリゴ糖は、還元末端の糖類が実際に還元糖であるか否かを問わず、還元末端と非還元末端とを有すると考えられる。一般的に認められた命名法にしたがって、オリゴ糖は、非

10

20

30

40

50

還元末端を左側におよび還元末端を右側にして本明細書に描かれる。本明細書で記述される全てのオリゴ糖は、非還元糖類に対する名称または略号(例えば、Gal)を記述し、その後グリコシド結合の立体配置(または)、環結合、結合に關与する還元糖類の環位置、次いで還元糖類の名称または略号(例えば、GlcNAc)が続く。二つの糖の間の結合は、例えば、2,3,2 3、または(2,3)として表すことができる。各糖類はピラノースである。

【0258】

本明細書では、N-結合糖部分とは、Asn残基のアミド窒素を介してsHASEGPに付着されるオリゴ糖を指す。N-結合オリゴ糖はいくつかの主要型(オリゴマンノース型、複合型、ハイブリッド型、硫酸型)に分類され、これらの全てが-Asn-Xaa-Thr/Ser-配列(式中XaaはProではない)に含まれるAsn残基のアミド窒素を介して付着されるコアの(Man)₃-GlcNAc-GlcNAc-を有する。N-結合部位は、配列決定の間の「ブランク」サイクルの出現により間接的に割り当てられることが多い。積極的な同定は、グリコシル化AsnをAspに変換するPNGase Fによるオリゴ糖の遊離後に行うことができる。PNGase Fによる遊離後、N-結合オリゴ糖をBio-Gel P-6クロマトグラフィーを用いて精製し、そのオリゴ糖のプールを分取用の高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8)にかけることができる。ある種のオリゴ糖異性体は、HPAECを用いて分離することができる。フコース残基はHPAECクロマトグラムで溶出位置を早くに移動させることになるが、付加的なシアル酸残基は保持時間を増大させることになる。オリゴ糖の構造が知られている糖タンパク質(例えば、ウシフェツイン、 α -1酸性糖タンパク質、オボアルブミン、RNase B、トランスフェリン)を同時に処理することで、オリゴ糖のピークの割り当てを容易にすることができる。回収されるオリゴ糖は、NMR分光法により割り当てられたアノマー配置(Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230)との、組成およびメチル化連鎖分析(Waeghe et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304.)の組み合わせにより特徴付けることができる。

【0259】

または、オリゴ糖は蛍光標識糖鎖電気泳動(FACE)法により同定することができる(Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281)。

【0260】

G. sHASEGPのN-結合糖部分の検出および特徴付け

タンパク質が実際にグリコシル化されるかどうかを決定することが、糖タンパク質グリカン分析の最初の段階である。ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)が、タンパク質配列決定前の最終段階として選択される方法になっている。グリコシル化タンパク質は、SDS-PAGEでは拡散したバンドとして移動することが多い。ペプチド-N₄-(N-アセチル-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ(PNGase F)による処理後の顕著なバンド幅の減少および移動位置の変化は、N-結合グリコシル化の指標になると考えられる。他のタイプのグリコシル化が優位であるならば、他のアプローチを利用する必要がある。レクチンプロット法により、グリコシル化の種類(N対O)には依存しないアプローチが提供される。さまざまな植物組織から得られる糖結合性タンパク質であるレクチンは、糖タンパク質グリカンに見出される多様な定義済みの糖エピトープに対して高い親和性と狭い特異性の両方を有する(Cummings, R. D. (1994) Methods in Enzymol. 230, 66-86.)。ビオチンまたはジゴキシゲニンとの複合体にすれば、それらは、ウエスタンプロット法で利用される二次抗体-アルカリホスファターゼ反応に似た、アビジンまたは抗ジゴキシゲニン抗体のアルカリホスファターゼ複合体を用いた比色反応(Haselbeck, et al. (1993) Methods in Mol. Biol. 14, 161-173.)により膜プロット上で容易に同定することができる。特異性が十分に定義されたレクチンのパネルを用いたスクリーニングにより、糖タンパク質の糖質補完体に関するかなりの情報を提供することができる。重要なのは、着色の増幅が十分に高く、10~50ngの糖タンパク質をSDS-PAGEの膜プロット上で容易に見ることができる。レクチンはその同族のリガンドに対し非常に高い親和性を示すが、実際に、構造的に関連したエピトープに対し顕著な結合活性を示すものもある。したがって、レクチンのパネルを選択する際に交差反応性の可能性に

注意深く留意すること、ならびに複合型、混成型および高マンノース型のN-結合グリカンをO-結合構造体とは別々に区別する確率が最も高いものを適用することが重要である。

【0261】

単糖類分析もsHASEGPがグリコシル化されるかどうかを決定するのに利用することが可能であり、およびレクチン分析の場合のように構造的特徴に関するさらなる情報を提供する。定量的な単糖類組成分析は、i) グリコシル化タンパク質を同定する、ii) タンパク質に対する個々の糖のモル比を与える、iii) 場合によっては、オリゴ糖類の存在を示す、iv) 構造解明の戦略を設計する際の最初の段階となる、およびv) 組換え糖タンパク質療法に対する産生の一貫性の程度を示す尺度を提供する。近年では、パルスドアンペロメトリー検出器を用いた高pH陰イオンクロマトグラフィー (HPAEC-PAD) が単糖類組成を決定するのに広く利用されている (Townsend, et al. (1995) in Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis (Z. El Rassi ed.). pp. 181-209.)。最近になって、フルオロフォアに基づく標識法が導入されており、多くはキット形式で利用することができる。蛍光法の別の利点は感度の増加(50倍)である。考えられる不都合の一つは、異なる単糖類は加水分解産物においてまたは外部標準混合物において、カップリング反応の間にフルオロフォアに対し異なる選択性を示す場合があるということである。しかしながら、感度の増加および利用できる糖タンパク質の総量のうちのごく一部からどの単糖類が存在するかを同定する能力、ならびにレーザー誘起蛍光法を用いるとさらに感度が高くなる可能性により、このアプローチは魅力的である。

10

【0262】

少量のsHASEGPの単糖類組成分析は、電気的プロッティング (Weitzhandler et al, (1993) J. Biol. Chem. 268, 5121-5130.) 後、またはさらに少ない一定分量をドットプロットで分析する必要がある場合、PVDF (PSQ) 膜で行われるのが最適である。PVDFは糖質分析に対する理想的な素材である。単糖類もオリゴ糖も、酸または酵素加水分解によりいったん遊離されれば、その膜には結合しないからである。

20

【0263】

FACE分析は、sHASEGPタンパク質のグリコシル化プロファイルを検出する効率的な手段である。30%オリゴ糖ゲルを用いたFACE(登録商標)N-結合オリゴ糖プロファイリング (Prozyme) はそのような機構の一つである。N-グリカナーゼ(別名PNGase)を用いた酵素消化により糖タンパク質100 µgから切断され、フルオロフォアANTSを用いて標識され、および電気泳動により分離されたオリゴ糖を、sHASEGPのグリコシル化プロファイルの検出に利用することができる。オリゴ糖のバンドの相対位置は、移動距離を重合度(DP)単位で指定したオリゴ糖スタンダードラダーとともに試料および試料の希釈物を泳動することにより決定する。

30

【0264】

H. sHASEGP活性を調節する化合物を同定するためのスクリーニング方法

何種類かのアッセイを本明細書で例示し記述する。ヒアルロニダーゼドメインを他のアッセイで利用できるということが理解されよう。しかしながら、本明細書ではヒアルロニダーゼドメインが触媒活性を示すことは明らかである。

【0265】

したがって、それらはインビトロスクリーニングアッセイに適している。

40

【0266】

それらを結合アッセイに使用することもできる。

【0267】

sHASEGPの完全長の酵素原、活性化酵素、およびヒアルロニダーゼドメインは、本明細書で提供されるものを含む、当業者に知られる任意のスクリーニングアッセイで用いるのに企図される。故に、以下の記述は、ヒアルロニダーゼアッセイを対象とする場合、一本鎖ヒアルロニダーゼドメインまたはsHASEGPを含めた任意のヒアルロニダーゼの触媒的に活性なその一部分の使用に当てはまると意図される。結合アッセイなどの他のアッセイは、特にsHASEGP(そのスプライス変異体などの任意の変異体を含む)とともに使用するため

50

に本明細書で提供される。

【0268】

1. sHASEGPタンパク質のヒアルロニダーゼ活性を調節する作用物質の同定のための触媒的アッセイ

sHASEGPの触媒活性の調節因子、特に一本鎖ヒアルロニダーゼドメインまたは触媒的に活性なその一部分を同定するための方法が本明細書で提供される。この方法は、sHASEGP、完全長の酵素原または活性化型、特にその一本鎖ドメインを試験基質の存在下でsHASEGPの基質と接触させること、および基質のタンパク質分解を検出し、それによりsHASEGPの活性を評価すること、およびその活性を対照と比較することにより実践することができる。例えば、対照は、完全長の酵素原または活性化型、特にその一本鎖ドメインを含むsHASEGPをsHASEGPの基質と接触させること、および基質のタンパク質分解を検出し、それによりsHASEGPの活性を評価することにより評価されたsHASEGPの活性とすることができる。試験化合物の存在下および非存在下での結果を比較する。活性の相違により、試験基質がsHASEGPの活性を調節することが示唆される。sHASEGP活性化切断の活性化因子も企図される；そのようなアッセイが以下に論ぜられる。

10

【0269】

一つの実施形態では、複数の試験基質が上記のスクリーニング法で同時にスクリーニングされる。他の実施形態では、sHASEGPは標的細胞から、その標的細胞に特異的な可能性がある作用物質を後に同定するための手段として単離される。

【0270】

20

他の実施形態では、試験基質は治療用化合物であり、その結果、試験基質の存在下および非存在下で測定したsHASEGP活性の相違は標的細胞が治療用化合物に反応することを示す。

【0271】

ある方法には、(a) sHASEGPポリペプチドまたはそのヒアルロニダーゼドメインを試験化合物の一つまたは複数と、リガンドと化合物との間の相互作用を助長する条件の下で接触させる段階；および(b) リガンドに特異的に結合する複数のなかで一つまたは複数の化合物を同定する段階が含まれる。

【0272】

本明細書で提供される別の方法には、a) sHASEGPポリペプチドまたはそのヒアルロニダーゼドメインをsHASEGPポリペプチドの基質と接触させる段階、および基質の分解を検出し、それによりsHASEGPポリペプチドの活性を評価する段階；b) sHASEGPポリペプチドを試験基質の存在下でsHASEGPポリペプチドの基質と接触させる段階、および基質の分解を検出し、それによりsHASEGPポリペプチドの活性を評価する段階；ならびにc) 段階a)およびb)で評価されたsHASEGPポリペプチドの活性を比較し、その結果、段階a)で測定された活性が段階b)で測定された活性と異なることにより、試験基質がsHASEGPポリペプチドの活性を調節することが示唆される段階が含まれる。

30

【0273】

他の実施形態では、複数の試験基質が同時にスクリーニングされる。試験基質がsHASEGPポリペプチドの調節因子であるかどうかを評価するために試験基質の存在下および非存在下でsHASEGPポリペプチドの活性を比較する場合、活性を並行してアッセイする必要はないが、そのような並行測定が典型的である。sHASEGPポリペプチドの活性を一度に測定し、測定された活性をsHASEGPポリペプチドの活性のこれまでの値と比較することが可能である。

40

【0274】

例えば、試験基質の存在下でsHASEGPポリペプチドの活性を測定して、試験基質の非存在下で以前に測定されたsHASEGPポリペプチドの活性のこれまでの値と比較することができ、その逆もまた同様である。これは、例えば、アッセイを行うためのキットとともに提供された挿入物または小冊子にsHASEGPポリペプチドの活性を示すことにより達成することができる。

50

【0275】

特定のsHASEGPに対する基質の選択方法が実施例に記述されており、特定のヒアルロニダーゼアッセイが例証される。

【0276】

アッセイを行うための使用説明書を任意で含む組合せを含んだ組合品およびキットが提供される。この組合品には、sHASEGPポリペプチドおよびアッセイするsHASEGPポリペプチドの基質；ならびに、任意で基質のタンパク質分解を検出するための試薬が含まれる。特定のsHASEGPポリペプチドによるタンパク質分解を受ける、グリコサミノグリカンを含め、色素産生性または蛍光発生性分子とできる基質は、sHASEGPポリペプチドが試験基質を切断する能力を試験することにより実験的に同定することができる。最も効率的に(すなわち、最低濃度および/もしくは最大速度でまたは所望の条件下で)切断される基質が同定される。

10

【0277】

本明細書でさらに提供されるのは、上記の組合せを含むキットである。このキットには、sHASEGPポリペプチドの活性の調節因子を同定するための使用説明書が任意で含まれる。任意のsHASEGPポリペプチドがその活性の調節因子を同定するための標的として企図される。

【0278】

2. 結合アッセイ

本明細書で同様に提供されるのは、作用物質、特にsHASEGPに結合する化合物の同定および単離のための方法である。このアッセイは、単離されたヒアルロニダーゼドメイン(またはsHASEGPポリペプチドのヒアルロニダーゼドメインを含む、sHASEGPポリペプチド以外のタンパク質)に結合する、および完全長の酵素原に由来するまたは拡張ヒアルロニダーゼドメインに由来する活性化型を含む、活性化型に結合する作用物質を同定するために設計される。同定された化合物は、異常なヒアルロニダーゼ活性を伴う障害および疾患の治療用の化合物の同定のための候補またはリードとなる。この方法で利用されるsHASEGPポリペプチドには、sHASEGPの一本鎖ヒアルロニダーゼドメインまたはそのタンパク質分解的に活性な部分を含む、本明細書で定義されるような任意のsHASEGPポリペプチドが含まれる。

20

【0279】

さまざまな方法が本明細書で提供される。これらの方法は、溶液中でまたはsHASEGPポリペプチドもしくはそのヒアルロニダーゼドメインが固相支持体に、直接的にもしくはリンカーを介して間接的に結び付けられた固相反応中で行うことができる。スクリーニングアッセイを実施例に記述しており、およびこれらのアッセイを利用して候補化合物を同定した。

30

【0280】

本明細書の目的の場合、上記の結合アッセイは全てsHASEGPのために提供される。

【0281】

sHASEGPの一本鎖ヒアルロニダーゼドメイン、完全長の活性化sHASEGPまたはその二本鎖ヒアルロニダーゼドメインに特異的に結合する、化合物などの作用物質の同定方法が本明細書で提供される。この方法は、(a) sHASEGPポリペプチドを試験作用物質の一つまたは複数と、sHASEGPと作用物質との間の結合を助長する条件の下で接触させること；および(b) sHASEGPに特異的に結合する複数のなかで一つまたは複数の作用物質を同定することにより実践することができる。

40

【0282】

例えば、そのような方法を実践する場合、sHASEGPポリペプチドを潜在的な結合パートナーまたは細胞の抽出物もしくは分画と、そのポリペプチドとの潜在的な結合パートナーの会合を可能とする条件の下で混合する。混合後、sHASEGPと会合したペプチド、ポリペプチド、タンパク質または他の分子を混合物から分離する。その後、sHASEGPに結合した結合パートナーを取り除いて、さらに分析することができる。結合パートナーを同定し且

50

つ単離するために、タンパク質全体、例えば、SEQ ID NO. 1に開示のタンパク質全体を使用することができる。または、タンパク質の断片を使用することができる。

【0283】

さまざまな方法を利用して、細胞抽出物または血液、血清、尿、汗、滑液、CSFおよび他のそのような体液などの、体液を得ることができる。

【0284】

例えば、細胞は、物理的または化学的な破壊方法を用いて破壊することができる。物理的破壊方法の例は、以下に限定されることはないが、超音波処理および機械的剪断を含む。化学的溶解方法の例は、以下に限定されることはないが、界面活性剤による溶解および酵素による溶解を含む。当業者は本方法で用いる抽出物を得るために細胞抽出物の調製方法を容易に適合させることができる。

【0285】

細胞の抽出物が調製されたら、抽出物をsHASEGPと、結合パートナーとのタンパク質の会合が起り得る条件の下で混合する。ヒト細胞の細胞質でまたは血液などの体液で見出される条件に似た条件を含めて、さまざまな条件を利用することができる。浸透圧、pH、温度、および使用する細胞抽出物の濃度などの特徴は、結合パートナーとのタンパク質の会合を最適化するように変化させることができる。同様に、体液からの対象とする分子の単離のための方法が知られている。

【0286】

適当な条件下で混合後、結合した複合体を混合物から分離する。さまざまな技術を利用して、混合物を分離することができる。例えば、sHASEGPに特異的な抗体を利用して、結合パートナー複合体を免疫沈降させることができる。または、クロマトグラフィーおよび密度/沈降遠心分離などの標準的な化学的分離技術を利用することができる。

【0287】

抽出物中の未会合の細胞構成物質を除去後、結合パートナーは、従来の方法を用いて複合体から解離させることができる。例えば、解離は、混合物の塩濃度またはpHを変化させることにより達成することができる。

【0288】

会合した結合パートナー対を混合抽出物から分離するのに役立つため、sHASEGPを固相支持体に固定化することができる。例えば、タンパク質をニトロセルロースマトリクスまたはアクリルビーズに付着させることができる。タンパク質またはその断片の固相支持体との付着は、ペプチド/結合パートナー対を抽出物に見出される他の構成物質から分離するのに役立つ。同定される結合パートナーは、単一のタンパク質または二つもしくはそれ以上のタンパク質からなる複合体とすることができる。

【0289】

または、一本鎖ヒアルロニダーゼをコードする核酸分子は、酵母ツーハイブリッド系で利用することができる。酵母ツーハイブリッド系は、他のタンパク質パートナー対を同定するために利用されており、本明細書で記述される核酸分子を利用できるように容易に適合させられる。

【0290】

特にsHASEGPに対する、別のインビトロ結合アッセイでは、これらのタンパク質のうちの一つの触媒ドメインと一つまたは複数の候補の結合標的または基質とを少なくとも含んだポリペプチドの混合物を利用する。適当な条件下で混合物をインキュベート後、sHASEGPまたは触媒ドメインを含むそのポリペプチド断片が候補の基質に結合するかまたはその基質と相互作用する能力を評価する。無細胞結合アッセイの場合、構成物質のうちのひとつが含まれるかまたは検出可能な標識に結合される。標識により、放射活性、発光、光学もしくは電子密度などのような直接的検出、またはエピトープタグ、酵素などのような間接的検出を提供することができる。標識および他のアッセイ構成成分の性質に応じ、さまざまな方法を利用して、標識を検出することができる。例えば、標識は固体基板との結合を検出することができる、または標識を含む結合複合体の部分を固体基板から分離して、そ

10

20

30

40

50

の後、標識を検出することができる。

【0291】

3. 膜結合型タンパク質であるsHASEGPのシグナル伝達の検出は、シグナル伝達に直接的にまたは間接的に、つまり細胞表面受容体として直接的にまたはシグナル伝達を開始できるプロ成長因子などの、タンパク質を活性化することにより間接的に関与することができる。さらに、SEQ ID NO. 4に記述されるようなsHASEGPの可溶性ドメインなどの、分泌型sHASEGPは、細胞表面受容体に結合するかもしれない受容体と相互作用することにより直接的にまたはシグナル伝達を開始できるプロ成長因子などの、タンパク質を活性化することにより間接的にシグナル伝達に関与することができる。シグナル伝達を評価するためのアッセイは、当業者によく知られており、sHASEGPポリペプチドで用いるのに適合させることができる。

10

【0292】

sHASEGP、特にその完全長または細胞の表面にsHASEGPのその細胞外ドメインもしくは機能的な部分を固定するのに十分な部分により、プロ成長因子の活性化によるような、直接的にまたは間接的に媒介されるシグナル伝達に影響を及ぼすかまたはその伝達を変化させる作用物質を同定するためのアッセイが提供される。そのようなアッセイには、例えば、伝達されるシグナルの調節がレポーター遺伝子の発現に対する影響を検出することにより評価される転写に基づくアッセイが含まれる(例えば、U.S. Patent No. 5,436,128を参照されたい)。

20

【0293】

4. sHASEGPをコードする核酸の発現を調節する作用物質の同定方法

他の実施形態により、sHASEGPをコードする核酸の発現を調節する作用物質の同定方法が提供される。そのようなアッセイでは、sHASEGPをコードする核酸の発現量の変化を監視する任意の利用可能な手段が使われる。

【0294】

各アッセイ形式を利用して、sHASEGPをコードする核酸の発現を調節する作用物質の能力を監視することができる。例えば、mRNA発現を核酸とのハイブリダイゼーションにより直接的に監視することができる。同様に、記述の酵素アッセイを利用して、sHASEGPの発現を調節する作用物質を検出することができる。

30

【0295】

細胞株を適当な条件および時間の下で、試験する作用物質にさらして、総RNAまたはmRNAを標準的な手順により単離する(例えば、Sambrook et al (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい)。作用物質にさらした細胞と対照細胞との間のRNA発現量の相違を検出するためのプローブは、核酸から調製することができる。高ストリンジェンシー条件下で標的核酸とのみハイブリダイズするプローブを設計することが典型的であるが、必ずしもその必要はない。高ストリンジェンシー条件下では、相補性が非常に高い核酸ハイブリッドのみが生ずる。したがって、アッセイ条件のストリンジェンシーにより、ハイブリッドを形成するために二本の核酸鎖間に存在すべき相補性の量が決定される。ストリンジェンシーは、プローブ:標的ハイブリッドと生じ得るプローブ:非標的ハイブリッドとの間の安定性の相違を最大とするように選択されるべきである。

40

【0296】

例えば、sHASEGPのN-およびC-末端断片を細菌で発現させて、これらの断片に結合するタンパク質を探索するために使用することができる。sHASEGPのN-またはC-末端領域とのHis-タグまたはGST融合体のような融合タンパク質を基質として用いるために調製することができる。これらの融合タンパク質は、例えば、グルタチオン-セファロースビーズに結合させて、その後、細胞溶解液または体液を探索することができる。溶菌前に、細胞または体液は、sHASEGPまたはそのドメインと相互作用するタンパク質を調節できる候補作用物質で処理することができる。融合タンパク質に結合する溶菌液のタンパク質は、当技術分野において知られているように、SDS-PAGEにより分離し、単離して、タンパク質配列決

50

定または質量分析により同定することができる。

【0297】

抗体プローブは、sHASEGPポリペプチドのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を、これらが十分な長さのもの(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40またはそれ以上の連続アミノ酸)であるなら、または免疫原性を増強させることが必要とされるのなら適当な担体に結合させて、用いて適当な免疫化手順で適当な哺乳類宿主を免疫することにより調製される。ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、または他の担体タンパク質などの担体との免疫原性結合体の調製方法は、当技術分野においてよく知られている。ある状況では、例えば、カルボジイミド試薬による直接的結合を効率的とすることができる; 他の場合には、Pierce Chemical社、Rockford, ILから供給されるものなどの連結試薬を、ハプテンに対する接近可能性を与えるのに所望とすることができる。ハプテンペプチドは、Cys残基によりアミノもしくはカルボキシ末端で拡張させることができる、または、例えば、担体との連結を容易とするためにシステイン残基を組み入れることができる。

10

【0298】

免疫原の投与は、当技術分野において一般に理解されるように、適当な期間にわたりおよび適当なアジュバントを用いて注射により一般に行われる。免疫化スケジュールの間に、抗体の力価を取って抗体形成の妥当性を決定する。

【0299】

抗ペプチド抗体は、例えば、sHASEGPのカルボキシ末端のアミノ酸に対応する合成ペプチドを用いて作製することができる。

20

【0300】

合成ペプチドは、わずか1~3アミノ酸長、一般に少なくとも4またはそれ以上のアミノ酸残基長とすることができる。ペプチドは、標準的な方法を用いてKLHに結合させることができ、およびウサギまたは有蹄動物などの動物に免疫することができる。ポリクローナル抗体をその後、例えば、共有結合したペプチドを含むアクチゲル(Actigel)ビーズを用いて精製することができる。

【0301】

このように産生されたポリクローナル抗血清はいくつかの用途には満足できるものとすることができるが、薬学的組成物の場合、モノクローナル製剤が一般に使用される。所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、一般に知られるように、Kohler et al., (Nature 256: 495-7 (1975))の標準方法またはリンパ球もしくは脾臓細胞の不死化をもたらず変更方法を用いて調製することができる。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原がペプチドハプテン、ポリペプチドまたはタンパク質である免疫測定法によりスクリーニングする。

30

【0302】

所望の抗体を分泌する適当な不死化細胞培養物が同定されたら、その細胞をインビトロでまたは腹水を介したインビボ産生により培養することができる。特に関心があるのは、sHASEGPの触媒ドメインまたは活性化切断部位(領域)を認識するモノクローナル抗体である。

40

【0303】

その抗体または断片を同様に産生させることができる。受容体の所望の領域に特異的に結合する領域を同様に、複数種由来のキメラとの関連で産生させることができる。

【0304】

上記の方法でアッセイされる作用物質は、無作為に選択されるかまたは合理的に選択されるかもしくは設計されることことができる。

【0305】

作用物質は、例えば、ペプチド、小分子、および糖質とすることができる。当業者は、作用物質の構造的性質には制限がないことを容易に認識することができる。

【0306】

50

ペプチド作用物質は、当技術分野において知られるように、標準的な固相(または液相)ペプチド合成方法を用いて調製することができる。さらに、これらのペプチドをコードするDNAは、市販のオリゴヌクレオチド合成機器を用いて合成することができる、および標準的な組換え産生系を用いて組換え産生することができる。固相ペプチド合成による産生は、遺伝子によりコードされないアミノ酸を含有させたいならば必要になる。

【0307】

1. 治療方法

本明細書の方法により同定されるsHASEGPは、動物、特にヒトを含む哺乳類におけるsHASEGP基質の異常な蓄積を治療するかまたは予防するために使用される。一つの実施形態では、この方法は、sHASEGP糖タンパク質の有効量を哺乳類に投与し、それにより疾患または障害を治療するかまたは予防することを含む。

10

【0308】

他の実施形態では、sHASEGP阻害物質は、過剰量の中性ヒアルロニダーゼ活性の治療で使用することができる。治療される哺乳類はヒトとすることができる。本明細書で提供される阻害物質は、スクリーニングアッセイにより同定されるものである。さらに、抗体およびアンチセンス核酸またはRNAiのような二本鎖RNA(dsRNA)が企図される。

【0309】

1. アンチセンス治療

特定の実施形態では、上述のように、sHASEGPポリペプチドの機能は、過剰なコンドロイチナーゼ活性を治療するかまたは予防するため、sHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸により低下されるかまたは阻害される。sHASEGPポリペプチドまたはその一部分をコードする遺伝子またはcDNAに対してアンチセンスである、少なくとも6ヌクレオチド、一般に最大で約150ヌクレオチドまでの核酸の治療的または予防的使用が提供される。本明細書ではsHASEGPポリペプチド「アンチセンス」核酸とは、いくらかの配列相補性に基づいておよび一般に高ストリンジェンシー条件下でsHASEGPポリペプチドRNA(一般にmRNA)の一部分にハイブリダイズできる核酸を指す。アンチセンス核酸は、sHASEGPポリペプチドmRNAのコードおよび/または非コード領域に相補的とすることができる。そのようなアンチセンス核酸は、sHASEGPポリペプチドの機能を低下させるかまたは阻害する治療法としての有用性があり、前述の障害の治療または予防で使用することができる。

20

【0310】

sHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドのものであり、および一般にオリゴヌクレオチド(6から50ヌクレオチドを含めて6から約150ヌクレオチドに及ぶ)である。アンチセンス分子は、ヒアルロニダーゼドメインの全部または一部に相補的とすることができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも125ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、DNAもしくはRNAまたはそのキメラ混合物もしくは誘導体もしくは改変型、一本鎖または二本鎖とすることができる。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で改変することができる。オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基、または細胞膜

30

(例えば、以下を参照されたい Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:

6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652 (1987);

PCT 公報国際公開公報第 88/09810号, 1988年12月15日に公開された)

40

もしくは血液脳関門(例えば、1988年4月25日付で公開されたPCT公開番号WO 89/10134を参照されたい)を隔てた輸送を促進する作用物質、ハイブリダイゼーション誘発性の切断剤(例えば、Krol et al., BioTechniques 6: 958-976 (1988)を参照されたい)またはインターカレート剤(例えば、Zon. Pharm. Res. 5: 539-549 (1988)を参照されたい)を含むことができる。

【0311】

50

sHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸は一般に、オリゴヌクレオチド、通常は一本鎖のDNAもしくはRNAまたはその類似体もしくはその混合物である。例えば、オリゴヌクレオチドには、ヒトsHASEGPポリペプチドをコードする核酸の一部にアンチセンスな配列が含まれる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野において一般に知られる置換基を用いてその構造上の任意の位置で改変することができる。

【0312】

sHASEGPポリペプチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-n-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(ACP3)_w、および2,6-ジアミノプリンを含むが、これらに限定されることのない基より選択される少なくとも一つの修飾塩基部分を含むことができる。

【0313】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含むがこれらに限定されない基より選択される少なくとも一つの修飾糖部分を含む。オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミドチオエート、ホスホルアミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはその類似体より選択される少なくとも一つの修飾リン酸骨格を含むことができる。

【0314】

オリゴヌクレオチドはa-アノマーオリゴヌクレオチドとすることができる。a-アノマーオリゴヌクレオチドは相補RNAと、各鎖が相互に並走する特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641 (1987))。

【0315】

オリゴヌクレオチドは、以下に限定されることはないが、ペプチド；ハイブリダイゼーション誘発性の架橋剤、輸送剤またはハイブリダイゼーション誘発性の切断剤のような、別の分子に結合させることができる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野において知られる標準的な方法により、例えば、自動DNA合成機(Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販されているような)の使用により合成することができる。実例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Stein et al., (Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988))の方法により合成することができる、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、微細孔性ガラスポリマー支持体の使用により調製することができる(Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7448-7451 (1988))など。特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドには、触媒RNAまたはリボザイム(例えば、1990年10月4日付で公開されたPCT国際出願WO 90/11364; Sarver et al., Science 247: 1222-1225 (1990)を参照されたい)が含まれる。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148 (1987))、またはキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330 (1987))である。

【0316】

または、オリゴヌクレオチドは、RNAiのような二本鎖RNA(dsRNA)とすることができる。

【0317】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、sHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸は、外来性配列からの転写により細胞内に産生される。

【0318】

例えば、ベクターは、これが細胞により取り込まれ、その細胞内でベクターまたはその一部分が転写されて、アンチセンス核酸(RNA)を産生するようにインビボに導入することができる。そのようなベクターに、sHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸をコードする配列が含まれることになる。そのようなベクターは、これが転写されて所望のアンチセンスRNAを産生することができるかぎり、エピソームのままであってもまたは染色体に挿入されてもよい。そのようなベクターは、当技術分野において標準的な組換えDNA技術法により構築することができる。ベクターは、プラスミド、ウイルス、または哺乳類細胞での複製および発現に使われる、当技術分野において知られる他のものとしてすることができる。sHASEGPポリペプチドのアンチセンスRNAをコードする配列の発現は、ヒトを含む哺乳類の細胞で作用できる当技術分野において知られる任意のプロモーターによることができる。そのようなプロモーターは、誘導的または恒常的としてすることができる。そのようなプロモーターは、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター(Yamamoto et al., *Ce//22*: 787-797 (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼ・プロモーター(Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., *Nature* 296: 39-42 (1982))などを含むがこれらに限定されることはない。

【0319】

アンチセンス核酸には、ヒトsHASEGPポリペプチド遺伝子を含め、sHASEGPポリペプチド遺伝子のRNA転写産物の少なくとも一部分に相補的な配列が含まれる。絶対的な相補性は必要とされない。腫瘍性疾患の治療または予防に効果的なsHASEGPポリペプチドのアンチセンス核酸の量は、疾患の性質に依存しており、標準的な臨床技術により実験的に決定することができる。

【0320】

可能であれば、ヒトでの試験および使用前に、インビトロの細胞で、その後、有用な動物モデル系でアンチセンスの細胞毒性を決定することが望ましい。

【0321】

2. RNA干渉

RNA干渉(RNAi)(例えば、Chuang et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4985を参照されたい)を利用して、sHASEGPをコードする遺伝子の発現を阻害することができる。干渉性RNA(RNAi)断片、特に二本鎖(ds)RNAiを利用して、sHASEGP機能の喪失をもたらすことができる。哺乳類、線虫(*C. elegans*)、ショウジョウバエ(*Drosophila*)および植物、ならびにヒトを含む生物で遺伝子を沈黙化させるためのRNAiの利用に関する方法が知られている

(例えば、以下を参照されたい Fire et al. (1998) *Nature* 391: 806-811; Fire (1999) *Trends Genet.* 15: 358-363; Sharp (2001) *Genes Dev.* 15: 485-490; Hammond et al. (2001) *Nature Rev, Genet.* 2: 110-119; Tuschl (2001) *Chem. Biochem.* 2: 239-245; Hamilton et al. (1999) *Science* 286: 950-952; Hammond et al. (2000) *Nature* 404: 293-296; Zamore et al. (2000) *Cell* 101: 25-33; Bernstein et al. (2001) *Nature* 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.* 15: 188-200; Elbashir et al. (2001) *Nature* 411: 494-498; 国際PCT出願国際公開公報第01/29058号; 国際PCT出願国際公開公報第99/32619号)

【 0 3 2 2 】

二本鎖RNA(dsRNA)を発現する構築物は、エピソームのままであるかまたはゲノムに組み込まれる複製可能なベクターを用いて、動物または植物などの宿主に導入される。適当な配列を選択することで、dsRNAの発現により、sHASEGPをコードする内在性mRNAの蓄積を妨げることができる。RNAiを利用して、インビトロでの発現を阻害することもできる。

【 0 3 2 3 】

sHASEGPに選択的(すなわち、特異的)な少なくとも約21(または21)ヌクレオチドを含む領域を利用して、RNAiを調製する。約21ヌクレオチドの小断片は、細胞に直接的に(すなわち、インビトロにまたはインビボに)形質転換することができる; 大きなRNAi dsRNA分子は一般に、それらをコードするベクターを用いて導入される。dsRNA分子は、少なくとも約21bp長またはそれ以上の長さ、例えば、50、100、150、200およびそれ以上の長さである。インビトロのおよびインビボの細胞に核酸分子を導入するための方法、試薬および手順は、当業者に知られている。

【 0 3 2 4 】

3. 遺伝子治療

例示的な実施形態では、sHASEGPポリペプチドまたはその機能的なドメインもしくは誘導体をコードするヌクレオチドの配列を含む核酸が、遺伝子治療により、sHASEGPポリペプチドの機能を促進させるために投与される。遺伝子治療とは、被験体への核酸の投与により行われる治療を指す。この実施形態では、核酸はそのコードするタンパク質を産生し、sHASEGPポリペプチドの機能を促進させることにより治療効果を媒介する。当技術分野において利用できる遺伝子治療のための方法のいずれかを使うことができる

(Goldspiel et al., Clinical

Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); and Morgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH 11 5: 155-215 (1993)を参照されたい)

。例えば、遺伝子治療のための治療用組成物の一つには、適当な宿主においてsHASEGPポリペプチドまたはそのドメイン、断片もしくはキメラタンパク質を発現する発現ベクターの一部となるsHASEGPポリペプチドをコードする核酸が含まれる。具体的には、そのような核酸は、sHASEGPポリペプチドのコード領域に作動可能に連結されたプロモーターであって、誘導的または恒常的、および任意で、組織特異的なプロモーターを有する。別の特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドをコードする配列およびその他の任意の所望の配列にゲノム中の所望の部位で相同組換えを促進する領域が隣接し、したがってsHASEGPタンパク質の核酸の染色体内発現をもたらす核酸分子が使用される(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989) ; Zijlstra et al., Nature 342 : 435-438 (1989))。

【 0 3 2 5 】

患者内への核酸の送達は、直接的(この場合、患者を核酸または核酸を運搬するベクターに直接さらす)、または間接的(この場合、細胞を最初にインビトロにおいて核酸で形質転換し、その後、患者内に移植する)とすることができる。これらの二通りのアプローチは、それぞれ、インビボまたはエクスピボ遺伝子治療として知られている。

【 0 3 2 6 】

特定の実施形態では、核酸は、これがコードする産物を産生するように発現される場合、インビボに直接投与される。これは、当技術分野において知られる数多くの方法のうちのいずれかにより、例えば、核酸を適当な核酸発現ベクターの一部として構築して、これを細胞内に入るように投与することにより、例えば、欠損もしくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いた感染により(U. S. Patent No. 4,980,286を参照

されたい)、または裸のDNAの直接注入により、または微小粒子射突(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)の利用、脂質もしくは細胞表面受容体またはトランスフェクション試薬による被覆、リポソーム、微小粒子、もしくは微小カプセル内への封入により、または核に入ることが知られているペプチドに核酸を連結させて投与することにより、受容体を介して飲食作用を受けるリガンドに核酸を連結させて投与すること(例えば、Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987)を参照されたい)(これを利用して、受容体を特異的に発現している細胞型を標的化することができる)などにより達成することができる。他の実施形態では、リガンドが融合性ウイルスペプチドであってエンドソームを破壊し、その結果、核酸がリソソーム分解を回避できる核酸-リガンド複合体を形成させることができる。他の実施形態では、核酸は、特異的な受容体の標的化により、細胞特異的な取り込みと発現を目的にインピボで標的化することができる(例えば、1992年4月16日付のPCT公開WO 92/06180 (Wu et al.); 1992年12月23日付のWO 92/22635 (Wilson et al.); 1992年11月26日付のWO 92/20316 (Findeis et al.); 1993年7月22日付のWO 93/14188 (Clarke et al.); 1993年10月14日付のWO 93/20221 (Young)を参照されたい)。または、核酸を細胞内に導入して、相同組換えにより発現用の宿主細胞DNA内に組み込むことができる(Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935 (1989); Zijistra et al., *Nature* 342: 435-438 (1989))。

【 0 3 2 7 】

特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドの核酸を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターを使用することができる(Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)を参照されたい)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組込みに必要とされないレトロウイルス配列を欠くように改変されている。遺伝子治療に使用されるsHASEGPポリペプチドの核酸は、患者内への遺伝子の送達を容易にするベクターにクローニングする。レトロウイルスベクターに関する詳細は、Boesen et al., *Biotherapy* 6: 291-302 (1994)のなかで見出すことができる。この文献には、化学療法にさらに抵抗性の幹細胞を作製するために造血幹細胞にmdr1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用が記述されている。

【 0 3 2 8 】

遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示している他の文献は、Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93: 644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83: 1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4: 129-141 (1993); および Grossman and Wilson, *Curr. Opin. In Genetics And Devel.* 3: 110-114 (1993)

である。

【 0 3 2 9 】

アデノウイルスは遺伝子治療で使用できる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは呼吸器上皮に遺伝子を送達するのに特に魅力的な媒体である。アデノウイルスは本来、呼吸器上皮に感染して、軽い疾患を引き起こす。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは非分裂細胞に感染できるという利点がある。Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499-503 (1993)に、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の総説が紹介されている。Bout et al., *Human Gene Therapy* 5: 3-10 (1994)により、赤毛猿の呼吸器上皮に遺伝子を移送するためのアデノウイルスベクターの使用が実証された。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の事例は、Rosenfeld et al., *Science* 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68: 143-155 (1992); およびMastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91: 225-234 (1993)のなかで見出すことができる。

【 0 3 3 0 】

アデノ随伴ウイルス(AAV)も同様に、遺伝子治療で用いることが提案されている(Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993))。

【0331】

遺伝子治療に対する他のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムの媒介による形質移入、またはウイルス感染のような方法により遺伝子を組織培養の細胞に移入することを含む。通常、移入の方法は、選択可能マーカーを細胞に移入することを含む。次いで、細胞を選択下に置いて、移入遺伝子を取り込んでおりその遺伝子を発現している細胞を単離する。次いで、そのらの細胞を患者に送達する。

【0332】

この実施形態では、生じた組換え細胞をインビボに投与する前に核酸を細胞中に導入する。その導入は、形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスまたはバクテリオファージ・ベクターによる感染、細胞融合、染色体を介した遺伝子移入、マイクロ細胞を介した遺伝子移入、スフェロプラスト融合などを含むがこれらに限定されない、当技術分野において知られる任意の方法により行うことができる。外来遺伝子を細胞中に導入する多数の技術は、当技術分野において知られており(例えば、Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)を参照されたい)、受容細胞に必要な発生的および生理的機能を破壊しないならば、利用することができる。その技術は細胞への核酸の安定移入をもたらすはずであり、したがって核酸は細胞により発現可能であり、一般的にその細胞の子孫により遺伝可能および発現可能である。

【0333】

生じた組換え細胞を当技術分野において知られるさまざまな方法により患者に送達することができる。ある実施形態では、上皮細胞を、例えば、皮下に注入する。他の実施形態では、組換え皮膚細胞を患者に付ける植皮として適用することができる。組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞)を静脈内に投与することができる。使用を想定する細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者が決定することができる。

【0334】

核酸を遺伝子治療の目的で導入できる細胞は、任意の所望の、利用可能な細胞型を包含し、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞; さまざまな幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または造血前駆細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓、および他のその供給源から得られる幹細胞などを含むがこれらに限定されることはない。

【0335】

例えば、遺伝子治療に使用される細胞は、患者にとって自家性である。組換え細胞を遺伝子治療に使用するある実施形態では、sHASEGPポリペプチドの核酸を細胞中に、その核酸が細胞またはその子孫により発現可能であるように導入し、次いでその組換え細胞を、治療効果を目的にインビボに投与する。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞を使用する。インビトロで単離および維持できる任意の幹細胞および/または前駆細胞を本実施形態により使用できる可能性がある。

【0336】

そのような幹細胞は、造血幹細胞(HSC)、皮膚および腸の内層などの上皮組織の幹細胞、胎児心筋細胞、肝臓幹細胞(1994年4月28日付のPCT公開WO 94/08598)、ならびに神経幹細胞(Stemple and Anderson, Cell 71: 973-985 (1992))を含むがこれらに限定されることはない。

【0337】

上皮幹細胞(ESC)または角化細胞は、周知の手順により皮膚および腸の内層などの組織から得ることができる(Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980))。皮膚のような重

10

20

30

40

50

層上皮組織では、基底層、つまり基底膜に最も近い層内の幹細胞の有糸分裂により再生が起っている。腸の内層内の幹細胞は、この組織の素早い再生速度を可能にしている。患者または供与者の皮膚または腸の内層から得られたESCまたは角化細胞は、組織培養で増殖させることができる(Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); Pittelkow and Scott, Cano. Clinic Proc. 61: 771 (1986))。ESCが供与者により提供される場合、宿主対移植片の活性を抑制する方法(例えば、放射線照射、適度な免疫抑制を促進させる薬剤または抗体の投与)を用いることもできる。

【0338】

造血幹細胞(HSC)に関して、HSCのインビトロでの単離、増殖、および維持を実現する任意の技術を実施形態で使用することができる。これを達成できる技術は、(a) 将来の宿主、もしくは供与者から単離された骨髓細胞からのHSC培養物の単離および樹立、または(b) 以前に樹立されたHSC長期培養物であって、同種のものまたは異種のものでできる培養物の使用を含む。

【0339】

非自家HSCは一般に、将来の宿主/患者の移植免疫反応を抑制する方法とともに使用されている。特定の実施形態では、ヒト骨髓細胞は、針吸引により後腸骨稜から得ることができる(例えば、Kodo et al., J. Clin. Invest. 73: 1377-1384 (1984)を参照されたい)。例えば、HSCを高度に濃縮されているかまたは実質的に純粋な形態にすることができる。この濃縮は、長期培養の前に、間に、または後に達成することができ、当技術分野において知られる任意の技術により行うことができる。骨髓細胞の長期培養物は、例えば、改良型のDexter細胞培養法(Dexter et al., J. Cell Physiol. 91: 335 (1977))またはWitlock-Witte培養法(Witlock and Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612 (1982))を利用することにより樹立し維持することができる。

【0340】

特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含み、したがって核酸の発現は適当な転写誘導因子の有無を制御することにより制御可能である。

【0341】

3. プロドラッグ

腫瘍の治療方法が提供される。この方法は、HASEGPにより特定部位で切断されて活性化薬物を放出するプロドラッグまたはインビボで活性化薬物に変換される前駆物質の投与により実践される。sHASEGP活性を発現する細胞と接触すると、プロドラッグは活性化薬物に変換される。プロドラッグは、標的とされるsHASEGPに対する基質が結合した、細胞毒性薬などの抗腫瘍薬のような活性薬剤またはその他の治療薬(TA)を含む複合物とすることができ、したがってその薬物または薬剤は、複合体の状態では、不活性であるかまたは細胞に入ることができないが、しかし切断により活性化される。プロドラッグは例えば、標的とされるsHASEGPにより触媒的に切断される、通常は比較的短い、二糖単位および約20個未満のコンドロイチン硫酸分子を含むことができる。細胞毒性薬は、アルキル化剤、抗増殖剤およびチューブリン結合剤を含むが、これらに限定されることはない。その他には、ビンカ(vinca)薬物、マイトマイシン、プレオマイシンおよびタキサンが挙げられる。

【0342】

J. 薬学的組成物および投与方法

1. 組成物の成分

活性化sHASEGPを含む薬学的組成物が本明細書で提供される。同様に提供されるのは、sHASEGPポリペプチドの活性を調節する化合物と他の治療または抗体化合物のようなヒアルロニダーゼ異常症の治療用の化合物との組合せである。

【0343】

sHASEGPポリペプチドおよび第二の薬剤は、同時にまたは連続的にまたは断続的に投与するために別々の組成物として包装することができる。あるいは、それらは、投与のために単一組成物としてまたは単一組成物として投与するために二つの組成物として提供する

ことができる。その組成物はキットとして包装することができる。

【0344】

2. 製剤および投与経路

本明細書で提供されるsHASEGPポリペプチドおよびその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは、薬学的組成物として、典型的には単回投与用に製剤化することができる。製剤中のポリペプチドの濃度は、投与後に、対象とする治療に有効な量の送達に有効である。典型的には、組成物は単回投与用に製剤化される。組成物を製剤化するのに、sHASEGPポリペプチド、その可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインまたはその混合物の重量画分(weight fraction)を、治療される病状が軽減されるかまたは改善されるような有効濃度で、選択の媒体中に溶解させ、懸濁させ、分散させるかまたは別の方法で混合させる。

10

【0345】

本明細書で提供されるsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの投与に適した薬学的担体または媒体は、特定の投与方法に適していることが当業者に知られているような任意の担体を含む。

【0346】

さらに、ポリペプチドは、組成物中で唯一の薬学的に活性な成分として製剤化することができ、または他の活性な成分と組み合わせることができる。組織標的化リポソームを含めて、リポソーム懸濁液を薬学的に許容される担体として適当とすることもできる。これらは当業者に知られる方法にしたがって調製することができる。例えば、リポソーム製剤は、U. S. Patent No. 4,522,811に記載されているように調製することができる。

20

【0347】

活性なsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは、治療する患者に望ましくない副作用を与えることなく治療的に有効な効果を及ぼすのに十分な量で薬学的に許容される担体中に含まれる。治療的に有効な濃度は、本明細書に提供されるアッセイの利用によるようなインビトロおよびインビボ系で周知のポリペプチドを試験することにより実験的に決定することができる。または、例えば、

Taliani *et al.* (1996) *Anal. Biochem.* 240: 60-67, Filocamo *et al.* (1997) *J.*

Virology 71: 1417-1427, Sudo *et al.* (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18, Buffard *et al.* (1995)

Virology 209: 52-59, Bianchi *et al.* (1996) *Anal. Biochem.* 237: 239-244, Hamatake *et al.*

30

(1996) *Intervirology* 39:249-258, Steinkühler *et al.* (1998) *Biochem.* 37:8899-8905, D'Souza

et al. (1995) *J. Gen. Virol.* 76:1729-1736, Takeshita *et al.* (1997) *Anal. Biochem.* 247: 242-

246; see also, e.g., Shimizu *et al.* (1994) *J. Virol.* 68: 8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) *J.*

Virol. 70: 7219-7223, Mizutani *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 822-826,

Lu *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 1412-1417, Hahm *et al.* (1996) *Virology*

226: 318-326, Ito *et al.* (1996) *J. Gen. Virol.* 77: 1043-1054, Mizutani *et al.* (1995) *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 212: 906-911, Cho *et al.* (1997) *J. Virol. Meth.* 65 :201-207

40

を参照されたい。次いで、その濃度からヒトに対する用量を外挿することができる。

【0348】

通常は治療的に有効な用量が企図される。投与される用量は、約0.005~0.05mg/血液容量mlおよび約0.01mg/血液容量mlを含めて、0.001~1mg/血液容量ml程度とすることができる。薬学的単位用量剤形は、単位用量剤形あたり必須の活性成分またはまたは必須の成分の組合せの約10~約500mgを含めて、および約25~約75mgを含めて、約1mg~約1000mgをもたらすように調製される。正確な用量は実験的に決定することができる。

【0349】

場合によっては、ヒトsHASEGPの高い単位用量が好ましい。例えば、sHASEGPの静脈内投

50

与では、1mlあたり500～100,000単位のsHASEGP濃度が好ましい。sHASEGPの凍結乾燥製剤は同様に、sHASEGPの大きな単位用量を保存するのに理想的である。sHASEGPの200,000単位の凍結乾燥バイアルが静脈内送達用に企図される。

【0350】

高濃度の用量が同様にsHASEGPの少容量の送達用に企図される。白内障および有水晶体眼内レンズ移植手術の間に予め投与された粘弾性物質を溶解するために、5000単位/mlのsHASEGP 10～100 μ lの投与が前房内の注入用に企図される。50～200 U/ml用量の少容量注入が同様に、糖尿病性網膜症における硝子体出血または硝子体-網膜(vitro-retinal)剥離の治療などの硝子体内処置用に企図される。

【0351】

活性成分は、一度に投与することができる、または間をおいて投与される数回分の少量に分割することができる。治療の正確な用量および期間は、治療されている疾患の働きによっており、周知の試験手順を利用して実験的にまたはインビボもしくはインビトロの試験データからの外挿により決定できるということが理解されよう。濃度および用量値は、軽減される病状の重症度によっても変化する可能性があるということにも注意すべきである。特定の被験体に対し、特定の投与計画が個人の必要性および組成物を投与しているかまたはその投与を監視している者の専門的な判断にしたがって長期にわたり調整されるべきであるということ、ならびに本明細書に記載の濃度範囲は、単なる例示にすぎず、特許請求される組成物およびそれらを含む組合せの範囲または用途を限定することを意図するわけではないということがさらに理解されるべきである。

【0352】

薬学的に許容される誘導体は、酸、塩、エステル、水和物、溶媒和物およびプロドラッグの形態を含む。その誘導体は通常、その薬物速度論的特性が、対応する中性sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインに優るように選択される。

【0353】

このように、本明細書のポリペプチドまたはその薬学的に許容される誘導体の一つまたは複数を有効な濃度または量で全身、局所外用(topical)または局所(local)投与用の適当な薬学的担体または媒体と混合して薬学的組成物を形成させる。sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは、治療を企図する障害を改善するかまたは治療するのに有効な量で含まれる。組成物中の活性なポリペプチドの濃度は、その活性なポリペプチドの吸収速度、不活化速度、排泄速度、投与計画、投与量、個々の製剤ならびに当業者に知られるその他の要因に依存する。

【0354】

本方法で用いる治療薬は、以下に限定されることはないが、局所外用的に、関節内に、大槽内に、眼内に、脳室内に、くも膜下腔内に、静脈内に、筋肉内に、腹腔内に、皮内に、気管内になど、当業者に知られるいずれかの経路により、ならびにそのいずれかの二つまたはそれ以上の経路のいずれかの組合せにより投与することができる。乾燥粉末の経路用製剤も想定することができる。

【0355】

投与に最も適した経路は、例えば、流体の皮下送達を容易にする送達剤としての用途、粘弾性物質の投与を受けている緑内障患者の眼の眼圧を低下させる用途または化学療法薬の活性を高める「展着剤」としての用途のような提案の用途、ならびに特定の臓器、腫瘍増殖部位、眼内腔および表皮などの対象とする部位に応じて変化することになる。投与方法は、以下に限定されることはないが、局所外用、局所、関節内、大槽内、眼内、脳室内、くも膜下腔内、静脈内、筋肉内、気管内、腹腔内、皮内による投与、およびそのいずれかの二つまたはそれ以上の組合せによる投与を含む。例えば、扁平上皮がん、乳がん、膀胱がんおよび消化管がんなどの各種のがんを治療する場合は、腫瘍増殖の部位に投与することを含めて、局所に(例えば、くも膜下腔内に、脳室内に、または大槽内に)投与することで、治療薬の全身性投与に付随して起り得る合併症の危険性なく、治療薬を高濃度で投与できるという利点が得られる。

10

20

30

40

50

【0356】

本明細書で提供されるsHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの投与に適した薬学的および化粧品的な担体または媒体は、特定の投与方法に適していることが当業者に知られているような任意の担体を含む。さらに、そのポリペプチドは組成物中で唯一の薬学的に活性な成分として製剤化することができ、または所望の作用を損なうことのない他の活性成分と、もしくは当業者に知られる所望の作用を補完する物質と組み合わせることができる。例えば、本明細書で提供されるsHASEGPポリペプチドは、第二の活性成分の送達を容易にするかまたはその成分の活性を高める、薬物またはプロドラッグを含むがこれらに限定されない、治療的に有効な薬剤などの、第二の活性化化合物と組み合わせて送達剤または「展着」剤として使用することができる。特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインをリグノカイン(Lignocaine)、ブピビカイン(Bupivacaine)またはこの二つの混合物などの麻酔薬と同時に製剤化することができ、および任意で、エピネフリンのようなホルモン剤と同時に製剤化して、眼科手術の間に血液の取り込みを減少させるかまたは止めることができる。sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを毒素および腫瘍壊死因子などの各種の化学療法薬と同時に製剤化して、化学療法薬の活性および/または化学療法薬との標的腫瘍の接近可能性を高めることもできる。活性化化合物は、治療する個体に深刻な毒性効果を与えることなく治療的に有用な効果を及ぼすのに十分な量で担体中に含まれる。有効な濃度は、本明細書に記載の動物モデルを含めて、インビトロおよびインビボ系を利用して化合物を試験することにより実験的に決定することができる。

10

20

【0357】

非経口の、皮内の、皮下の、または局所外用の投与に使われる溶剤または懸濁剤は、以下の成分のいずれかを含むことができる：注射用蒸留水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールおよびメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸および亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化物質；エチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤；酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液およびリン酸緩衝液などの緩衝液；ならびに塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、デキストロース、グリセロールまたはホウ酸を含むがこれらに限定されない等張性を調整する作用物質。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器またはガラス、プラスチックもしくはその他の適当な素材でできた単回もしくは複数回投与バイアルの中に密封することができる。

30

【0358】

sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを微粒の(micronized)もしくはその他の適当な形態に懸濁させることができ、またはこれを誘導体化してさらに溶解性の高い産物とするかもしくはプロドラッグとすることができる。得られる混合物の形態は、意図する投与方法および選択の担体または媒体中でのポリペプチドの溶解性を含めて、いくつかの要因に依存する。その有効濃度は、標的の病状を改善するのに十分なものであり、当業者に知られる方法を利用して実験的に決定することができる。組成物を製剤化するのに、ポリペプチドの重量画分(weight fraction)を、治療される病状が軽減されるかまたは改善されるような有効濃度で、選択の媒体中に溶解させ、懸濁させ、分散させるかまたは別の方法で混合させる。

40

【0359】

sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインが十分な溶解性を示さない場合には、ポリペプチドを可溶化する方法を利用することができる。そのような方法は、当業者に知られており、ジメチルスルホキシド(DMSO)などの共溶媒を利用すること、TWEEN(登録商標)およびPluronic(登録商標) F68などの表面活性剤(surfactant)を利用すること；または水性重炭酸ナトリウム中に溶解することを含むが、これらに限定されることはない。ポリペプチドのプロドラッグのような、ポリペプチドの誘導体を有効な薬学的組成物の製剤化に利用することもできる。眼に適應する場合、組成物は眼科的に許容される担体中に製剤化する。本明細書の眼科用途の場合、局所外用投与によるまたは注

50

入による局所投与が企図される。持続放出性製剤も望ましい。典型的には、組成物は単回投与用に製剤化し、したがって単回用量で有効量が投与される。

【0360】

ポリペプチドを媒体と混合してまたはポリペプチドを媒体に付加して、得られる混合物を溶液、懸濁液、乳濁液またはその他の組成物とすることができ、これを水性混合物、クリーム剤、ゲル剤、軟膏剤、乳剤、溶剤、エリキシル剤、ローション剤、懸濁剤、チンキ剤、ペースト剤、泡状物質、エアロゾル、洗浄剤、噴霧剤、坐剤、絆創膏、または全身、局所外用もしくは局所投与に適したその他の任意の製剤として製剤化することができる。

【0361】

得られる混合物の形態は、意図する投与方法および選択の担体または媒体中での化合物の溶解性を含めて、いくつかの要因に依存する。必要に応じて、化合物の薬学的に許容される塩またはその他の誘導体を調製する。筋肉内、非経口または関節内投与などの局所性の体内投与の場合、化合物を等張的に緩衝化された生理食塩溶液のような水性媒体中の懸濁液として製剤化することが好ましい、または体内投与を対象とした生体適合性もしくは生体接着性の支持体と混合する。

【0362】

sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは、治療する患者に望ましくない副作用を与えることなく治療的に有用な効果を及ぼすのに十分な量で薬学的に許容される担体中に含まれる。副作用の回数および程度は、化合物を投与する病状に依存することが理解されよう。例えば、ある種の有毒なおよび望ましくない副作用は、致命的な病気を治療する場合には許容されるものであり、重要性の低い障害を治療する場合には許容されないであろう。治療用途に有効な量は、もちろん、疾患の重症度ならびに被験体の体重および一般的症状のほかに投与経路に依存することになる。治療薬の局所性投与は、通常、どの全身性の投与方法よりも少ない用量で済むが、局所性投与後には、治療薬の局所濃度は、場合により、全身性投与後に安全に達成することができるよりも高くすることができる。

【0363】

個々の被験体は症状の重症度が幅広く異なる可能性があることや各治療薬はその特有の治療特性を有するので、治療に対する被験体の反応を判定し、それに依りて用量を変えることは熟練者に委ねられる。薬学的組成物の原位置での投与に有用な量について、インビトロで用いられる用量から有用な指針を得ることができ、場合によっては、動物モデルを利用して特定の障害を治療するのに有効な用量を決定することができる。しかしながら、一般的には、局所性投与の場合、治療薬の有効量は体重1kgあたり約0.1ピコグラム(pg)から最大で約1ngまでの範囲内の量になるものと考えられる。有効量に到達するのに考慮すべき種々の事柄が、当業者に知られており、記述されている(例えば、Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; および神経細胞特異的ナリガンド-毒素の髄膜注射を含むMantyh et al., (Science, 278: 275-79, 1997)を参照されたい、これらの文献はそれぞれその全体が参照として本明細書に組み入れられる)。

【0364】

本明細書で用いるsHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの製剤は、経口投与、直腸投与、局所外用投与、吸入投与、口腔内投与(例えば、舌下投与)、非経口投与(例えば、皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、または静脈内投与)、経皮投与または任意の経路に適したものを含む。所与のどんな場合であれ最も適した経路は、治療している症状の性質および重症度に依存し、ならびに使用している特定の活性化合物の性質に依存する。その製剤は、そのポリペプチドおよび/または他の薬剤もしくはその薬学的に許容される誘導体を適当な量で含有する錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、無菌の非経口溶剤もしくは懸濁剤、および経口溶剤もしくは懸濁剤、ならびに油-水乳剤などの単位用量剤形でヒトおよび動物に投与するために提供される。薬剤治療的に活

10

20

30

40

50

性なポリペプチドならびに/または他の薬剤およびその誘導体は通常、単位用量剤形または複数用量剤形で製剤化されて投与される。本明細書では単位用量剤形とは、ヒトおよび動物の被験体に適した物理的に別個の単位であって、当技術分野において知られるように個別包装される単位を指す。

【0365】

その薬学的組成物は、sHASEGPポリペプチドまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインおよび任意で、他の薬剤またはその薬学的に許容される誘導体を適当な量で含有する錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、無菌の非経口溶剤または懸濁剤、および経口溶剤または懸濁剤、ならびに油-水乳剤などの単位用量剤形でヒトおよび動物に投与するために提供される。薬剤治療的に活性な化合物およびその誘導体は通常、単位用量剤形または複数用量剤形で製剤化されて投与される。本明細書では単位用量剤形とは、ヒトおよび動物の被験体に適した物理的に別個の単位であって、当技術分野において知られるように個別包装される単位を指す。各単位用量は、必要な薬学的担体、媒体または希釈剤と関連して、所望の治療効果をもたらすのに十分な治療的に活性な化合物の所定量を含む。単位用量剤形の例としてはアンプル、注射器および個別包装の錠剤またはカプセル剤が挙げられるが、これらに限定されることはない。例えば、sHASEGP 1~5000単位が入った安定化溶液を5~50 μ lなど、少容量で含む少容量製剤を粘弾性注射液の後などで用いる注射器の中に予め包装することができる。単位用量剤形は、その分割でまたは倍数で投与することができる。複数用量剤形は、複数の同じ単位用量剤形を単一の容器中に包装し、分別した単位用量剤形として投与されるものである。複数用量剤形の例としては、バイアル(水薬瓶)、錠剤もしくはカプセル剤の瓶またはポイントもしくはガロン瓶が挙げられる。故に、複数用量剤形は、包装で分別されていない複数の単位用量のものである。

【0366】

その組成物は、sHASEGPポリペプチドなどの活性成分とともに、ラクトース、スクロース、第二リン酸カルシウム、またはカルボキシメチルセルロースなどの希釈剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルクなどの滑沢剤；ならびにデンプン、アカシアゼラチンゴムのよう天然ゴム、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン(polvinylpyrrolidone)、セルロースとその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよび当業者に知られる他のそのような結合剤などの結合剤を含むことができる。医薬投与可能な液体組成物は、例えば、上で定義した活性化合物および任意で補助薬を、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、グリコール、エタノール、および同様のものなどの担体の中に溶解させ、分散させるかまたは別の方法で混合させて、それにより溶液または懸濁液を形成させることにより調製することができる。必要に応じて、投与される薬学的組成物は同様に、湿潤剤、乳化剤、または可溶化剤、pH緩衝剤および同様のもの、例えば、酢酸塩、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン、酢酸ナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミン、および他のそのような薬剤などの無毒性の補助剤を微量で含むことができる。そのような剤形を調製する方法は、当業者に知られているかまたは当業者には明らかであろう(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975を参照されたい)。投与される組成物または製剤は、活性化合物の量を、治療を施行している被験体の症状を軽減するのに十分な量で含む。例えば、本明細書で提供されるsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの標準的な安定化製剤は、EDTA、NaClおよびCaCl₂溶液中で製剤化した150単位/mlの可溶性糖タンパク質を含む。さらに、チオメルサル(thiomersal)を含むがこれに限定されない、抗菌剤または抗真菌剤を製剤中に存在させることができる。本明細書で提供される他の製剤は、EDTA、NaClおよびCaCl₂溶液中に溶解したsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの安定化溶液または凍結乾燥形態のものであり、この製剤は13mg/mlなどのラクトースの添加とともに、その可溶性糖タンパク質を150単位/mlなどの有効活性量で含んでいる。同様に本明細書で提供されるのは、EDTA、NaClおよびCaCl₂溶液中に溶解したsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの安定化溶液または凍結乾燥形態を含む製剤で

10

20

30

40

50

あり、この製剤は13mg/mlなどのラクトース、ならびにアルブミン、Pluronic(登録商標) F68、TWEEN(登録商標)および/またはその他の界面活性剤の添加とともに、その可溶性糖タンパク質を150単位/mlなどの有効活性量で含んでいる。凍結乾燥されるかまたは安定化溶液として本明細書で提供されるその他の製剤は、EDTA、NaClおよびCaCl₂溶液中に溶解したsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを1~300単位/mlなどの有効活性量で含んでいる。

【0367】

平衡を無毒性の担体で保ち活性成分を0.005%~100%の範囲で含有する剤形または組成物を調製することができる。経口投与の場合、薬学的組成物は、例えば、結合剤(例えば、予めゼラチン化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース); 賦形剤(例えば、ラクトース、微結晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム); 滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ); 錠剤分解物質(例えば、ジャガイモデンプンまたはカルボキシメチルスターチナトリウム); または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの薬学的に許容される賦形剤を用いる従来法により調製した錠剤またはカプセル剤の形態をとることができる。錠剤は当技術分野においてよく知られる方法により被覆することができる。

【0368】

sHASEGPもしくはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインまたは薬学的に許容される誘導体は、その可溶性糖タンパク質が体内から直ぐに除去されてしまうことを防ぐ、持続放出性の製剤またはコーティングのような、担体とともに調製することができる。この組成物は、いくつかの特性の所望の組合せを得るため、化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、抗菌薬、抗アメーバ薬、抗トリコモナス薬、抗パーキンソン薬、抗マラリア薬、抗けいれん薬、抗うつ薬、および抗関節炎薬、抗真菌薬、血圧降下薬、解熱薬、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン薬、 α -アドレナリン作動薬、遮断薬、麻酔薬、気管支拡張薬、殺生物剤(biocide agent)、殺菌剤、静菌剤、アドレナリン遮断薬、カルシウムチャンネル遮断薬、心臓脈管薬、避妊薬、鬱血除去薬(decongestant agent)、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質剤、催眠薬(hypnotic agent)、ホルモン薬、血糖上昇薬、筋弛緩薬、筋収縮薬、眼薬、副交感神経興奮薬、精神賦活薬、点眼薬、副交感神経興奮薬、精神賦活薬、鎮静薬、交感神経様作用薬、精神安定薬、尿薬、膾薬、殺ウイルス剤、ビタミン薬、非ステロイド性抗炎症薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、ポリペプチド、タンパク質、核酸、薬物、プロドラッグ、有機分子ならびに入眠薬(sleep inducer)を含むがこれらに限定されない、疾患または病状の一つまたは複数の治療に価値があることが一般技術分野において知られているその他の薬学的に有効な薬剤を含むことができる。そのような併用療法は、本明細書で提供される治療の組成物および方法のさらなる局面を構成するものと理解されるべきである。

【0369】

1. 経口投与用の組成物

経口医薬剤形は固体、ゲルまたは液体のものである。固体剤形は錠剤、カプセル剤、顆粒剤、およびバルクパウダーのものである。経口錠剤のタイプは、圧縮された、咀嚼(chewable)トローチ剤および錠剤を含み、これらは腸溶コーティング、糖衣コーティングまたはフィルムコーティングされてもよい。カプセル剤は硬質または軟質ゼラチンカプセルとすることができ、いっぽう顆粒剤および散剤は当業者に知られるその他の成分の組合せとともに非発泡性または発泡性の形態で供与することができる。

【0370】

sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを含む薬学的組成物は、液体の形態、例えば、溶液、シロップもしくは懸濁液とすることができ、または使用前に水もしくはその他の適当な媒体で再構成するような製剤として供与することができる。そのような液状製剤は、懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂油); 乳化剤(例えば、レシチンまたはアカシア); 非水性媒体(例えば、扁桃油、油性エステル、または分画植物油); および保存剤(例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル

もしくはプロピルまたはソルビン酸)などの薬学的に許容される添加剤とともに従来の方法により調製することができる。

【0371】

ある種の実施形態では、その製剤は固体剤形、好ましくはカプセル剤または錠剤である。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤および同様のものは、以下の成分のうちのいずれか、または似た性質の化合物を含むことができる：結合剤；希釈剤；崩壊剤；滑沢剤；流動促進剤；甘味剤；および香料添加剤。

【0372】

結合剤の例としては、微結晶性セルロース、トラガカント・ゴム、グルコース溶液、アラビアゴム粘液、ゼラチン溶液、スクロースおよびデンプン糊が挙げられる。滑沢剤としては、タルク、デンプン、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸カルシウム、石松子およびステアリン酸が挙げられる。希釈剤としては、例えば、ラクトース、スクロース、デンプン、カオリン、塩、マンニトールおよび第二リン酸カルシウムが挙げられる。流動促進剤としては、コロイド状二酸化ケイ素が挙げられるが、これに限定されることはない。崩壊剤としては、カルメロースナトリウムの架橋重合体、カルボキシメチルスターチナトリウム、アルギン酸、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、ベントナイト、メチルセルロース、寒天およびカルボキシメチルセルロースが挙げられる。着色剤としては、例えば、認証取得されている水溶性FDおよびC色素、その混合物；ならびに水酸化アルミニウム溶液に対し懸濁した水不溶性のFDおよびC色素のいずれかが挙げられる。甘味剤としては、スクロース、ラクトース、マンニトールおよびサッカリンのような人工甘味剤、ならびにたくさんの噴霧乾燥フレーバーが挙げられる。香料添加剤としては、果実類などの植物から抽出した天然香料ならびに以下に限定されることはないが、ペパーミントおよびサリチル酸メチルなどの心地良い感覚をもたらす合成による混合化合物が挙げられる。湿潤剤としては、モノステアリン酸プロピレングリコール、ソルビタンモノオレート、ジエチレングリコールモノラウレートおよびポリオキシエチレンラウリルエーテル (polyoxyethylene laural ether) が挙げられる。腸溶コーティングとしては、脂肪酸、脂質、ろう剤、シェラック、アンモニア処理したシェラックおよび酢酸フタル酸セルロースが挙げられる。フィルムコーティングとしては、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリエチレングリコール4000および酢酸フタル酸セルロースが挙げられる。

【0373】

経口投与が望ましい場合、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは、胃の酸性の環境からこれを保護する組成物の中に供与することができるであろう。例えば、この組成物を胃の中ではその完全性を維持し、腸の中ではその活性化合物を放出する腸溶コーティングとして製剤化することができる。この組成物を制酸剤または他のそのような成分と組み合わせて製剤化することもできる。

【0374】

投与単位剤形がカプセル剤である場合、その組成物は、上記のタイプの原材料に加えて、脂肪油などの液体担体を含むことができる。さらに、投与単位剤形は、剤形の物理的形狀を変えるその他各種の原材料、例えば、糖衣コーティングおよびその他の腸溶剤を含むことができる。その化合物をエリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、オブラート剤、スプリングル、チューインガム剤または同様のものの一成分として投与することもできる。シロップ剤は活性化合物のほかに、甘味剤としてスクロースを含むことができ、ある種の保存剤、色素および着色料ならびに香料を含むことができる。

【0375】

sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインは同様に、所望の作用を損なうことがないその他の活性物質と、または制酸剤、H₂遮断薬、および利尿薬のような、所望の作用を補完する物質と混合することができる。その活性成分は本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される誘導体である。活性成分を最高で約98重量%までの高濃度で含むことができる。

10

20

30

40

50

【0376】

錠剤に含まれる薬学的に許容される担体は、結合剤、滑沢剤、希釈剤、崩壊剤、着色剤、香料添加剤、および湿潤剤である。腸溶性錠剤は、その腸溶コーティングのために、胃酸の作用に抵抗性があり、中性またはアルカリ性の腸の中では溶けるかまたは分解する。糖衣錠は、薬学的に許容される物質の異なる層を塗布した圧縮錠である。フィルムコート錠は、ポリマーまたはその他の適当なコーティングで被覆されている圧縮錠である。複数圧縮錠(Multiple compressed tablet)は、先に述べた薬学的に許容される物質を用いた2回以上の圧縮サイクルによって作り出される圧縮錠である。上記の剤形に着色剤を使用することもできる。香料添加剤および甘味剤は、圧縮錠、糖衣錠、複数圧縮錠および咀嚼錠に使用されている。香料添加剤および甘味剤は、咀嚼錠およびトローチ剤を形成するうえでとりわけ有用である。

10

【0377】

液体の経口剤形としては、水溶剤、乳剤、懸濁剤、溶剤ならびに/または非発泡顆粒から再構成された懸濁剤および発泡顆粒から再構成された発泡製剤が挙げられる。水溶剤としては、例えば、エリキシル剤およびシロップ剤が挙げられる。乳剤は水中油型または油中水型のものである。

【0378】

エリキシル剤は、澄明な、甘味を有する水性アルコール性の製剤である。エリキシル剤で使用される薬学的に許容される担体としては、溶解剤が挙げられる。シロップ剤は糖質、例えば、スクロースを濃縮した水溶剤であり、これは保存剤を含むことができる。乳剤は二相系のものであり、この中では、一方の液体が細かい小滴の形態になってもう一方の液体全体に分散している。乳剤で使用される薬学的に許容される担体は、薬剤および保存剤を乳化する非水性の液体である。懸濁剤には薬学的に許容される懸濁化剤および保存剤が使われる。液体の経口剤形に再構成される、非発泡顆粒に使われる薬学的に許容される物質としては、希釈剤、甘味料および湿潤剤が挙げられる。液体の経口剤形に再構成される、発泡顆粒に使われる薬学的に許容される物質としては、有機酸および二酸化炭素源が挙げられる。上記の剤形の全てで着色剤および香料添加剤が使用されている。

20

【0379】

溶解剤としては、グリセリン、ソルビトール、エチルアルコールおよびシロップが挙げられる。保存剤の例としては、グリセリン、メチルおよびプロピルパラベン、安息香酸(benzoic add)、安息香酸ナトリウムならびにアルコールが挙げられる。乳剤に使用される非水性の液体の例としては、鉱物油および綿実油が挙げられる。乳化剤の例としては、ゼラチン、アカシア、トラガカント、ベントナイト、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレートなどの表面活性剤が挙げられる。懸濁化剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ペクチン、トラガカント、ビーガム(Veegum)およびアカシアが挙げられる。希釈剤としては、ラクトースおよびスクロースが挙げられる。甘味剤としては、スクロース、シロップ、グリセリンおよびサッカリンのような人工甘味剤が挙げられる。湿潤剤としては、モノステアリン酸プロピレングリコール、ソルビタンモノオレート、ジエチレングリコールモノラウレートおよびポリオキシエチレンラウリルエーテルが挙げられる。有機添加剤としては、クエン酸および酒石酸が挙げられる。二酸化炭素源としては、重炭酸ナトリウムおよび炭酸ナトリウムが挙げられる。着色剤としては、認証取得されている水溶性FDおよびC色素、ならびにその混合物のいずれかが挙げられる。香料添加剤としては、果実類などの植物から抽出した天然香料、および心地良い味覚をもたらす合成による混合化合物が挙げられる。

30

40

【0380】

固体剤形の場合、その溶液または懸濁液は、例えばプロピレンカーボネート、植物油またはトリグリセリド中として、ゼラチンカプセルの中に封入されている。このような溶液、ならびにその製剤およびカプセル封入は、U.S. Patent No 4,328,245、4,409,239および4,410,545に開示されている。液体剤形の場合、その溶液は、例えばポリエチレングリコール中として、薬学的に許容される担体、例えば、水の十分量で希釈して、投与するの

50

に容易に量り取ることができる。

【0381】

あるいは、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを植物油、グリコール、トリグリセリド、プロピレングリコールエステル(例えば、プロピレンカーボネート)およびそのような他の担体中に溶解させるかまたは分散させて、これらの溶液または懸濁液を硬質または軟質ゼラチンカプセルの殻体中にカプセル封入することにより、液体または半固体の経口製剤を調製することができる。他の有用な製剤としては、U.S. Patent No. Re 28,819および4,358,603に記載されているものが挙げられる。

【0382】

口腔(舌下)投与に適した製剤としては、例えば、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを味付けの基剤、通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガカントの中に含有するトローチ剤、ならびにその化合物をゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアなどの不活性な基剤の中に含有する芳香錠が挙げられる。

【0383】

全ての実施形態において、錠剤およびカプセル剤の製剤は、活性成分の溶解具合を変化させるかまたは持続するため、当業者により知られているように被覆することができる。すなわち、例えば、それらの製剤は、サリチル酸フェニル、ろう剤および酢酸フタルセルロースなどの、腸により消化可能な従来型のコーティングで被覆することができる。

【0384】

2. 注射剤、溶剤および乳剤

皮下による、筋肉内によるまたは静脈内による注射によって一般的には特徴付けられる、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの非経口投与が同様に本明細書で企図される。注射剤は、溶液または懸濁液の液体形態として、注射の前に液体中で溶液または懸濁液とするのに適した固体形態として、あるいは乳濁液として、従来形態に調製することができる。適当な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールである。さらに、必要に応じて、投与される薬学的組成物は同様に、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解促進剤、ならびに例えば、酢酸ナトリウム、ソルピタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミンおよびシクロデキストリンなどの他のそのような作用物質などの無毒性の補助剤を微量で含むことができる。一定水準の投与が持続されるような、徐放性(slow-release)または持続放出性(sustained-release)の系を移植すること(例えば、U. S. Patent No. 3,710,795を参照されたい)が同様に本明細書で企図される。そのような非経口組成物に含まれるsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインのパーセンテージは、その特異性、ならびにその化合物の活性および被験体の必要性に依存する。

【0385】

組成物の非経口投与としては、静脈内投与、皮下投与および筋肉内投与が挙げられる。非経口投与用の製剤としては、注射用に用意された滅菌溶液、使用の直前に溶媒または滅菌溶液と混合するように用意されている、皮下注射用錠剤を含めて、凍結乾燥粉末などの滅菌乾燥状態の可溶性生成物、注射用に用意された滅菌懸濁液、使用の直前に媒体と混合するように用意されている滅菌乾燥状態の不溶性生成物、および滅菌乳濁液が挙げられる。その溶液は水溶液または非水溶液とすることができる。

【0386】

静脈内に投与する場合、適当な担体としては、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ならびにグルコース、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールやその混合物などの増粘剤および可溶化剤を含有する溶液が挙げられる。

【0387】

非経口製剤に使用される薬学的に許容される担体としては、水性媒体、非水性媒体、抗菌剤、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、局所麻酔薬、懸濁化および分散化剤、乳化剤、金属イオン封鎖またはキレート剤ならびにその他の薬学的に許容される物質が挙げられる。

【0388】

10

20

30

40

50

水性媒体の例としては、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張デキストロース注射液、注射用滅菌水、デキストロースおよび加乳酸リンゲル注射液が挙げられる。非経口用の非水性媒体としては、植物性の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油および落花生油が挙げられる。抗菌剤は静菌的または静真菌的な濃度で、複数回使用容器の中に包装される非経口製剤に添加しなければならず、その抗菌剤としては、フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、p-ヒドロキシ安息香酸メチルエステルおよびp-ヒドロキシ安息香酸プロピルエステル、チメロサル(thiomersal)、塩化ベンザルコニウムならびに塩化ベンゼトニウムが挙げられる。等張剤としては塩化ナトリウムおよびデキストロースが挙げられる。緩衝剤としてはリン酸緩衝剤およびクエン酸緩衝剤が挙げられる。抗酸化剤としては重硫酸ナトリウムが挙げられる。局所麻酔薬としては塩酸プロカインが挙げられる。懸濁化および分散化剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンが挙げられる。乳化剤としてはポリソルベート80 (TWEEN(登録商標)80)が挙げられる。金属イオン封鎖またはキレート剤としてはEDTAが挙げられる。薬学的担体としては同様に、水混和性媒体に使うエチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールならびにpH調整に使う水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸または乳酸が挙げられる。

10

【0389】

薬学的に活性化化合物の濃度は、注射によって、所望の薬理効果をもたらすのに有効な量が供与されるように調整する。正確な用量は、当技術分野において知られているように、患者または動物の年齢、体重および状態に依存する。

20

【0390】

単位用量の非経口製剤は、アンプル、バイアルまたは針付きの注射器の中に包装されている。非経口投与用の製剤は全て、当技術分野において知られ実践されているように、無菌でなければならない。

【0391】

例えば、活性化化合物を含んだ滅菌水溶液の静脈内または動脈内注入は、有効な投与方法である。別の実施形態は、所望の薬理効果をもたらすのに必要に応じて注射される活性物質を含んだ無菌の水性または油性の溶液または懸濁液である。

【0392】

注射剤は局所性および全身性投与用に設計されている。通常は、治療的に有効な用量は、治療組織に対し活性化化合物を少なくとも約0.1% w/wから最大で約90% w/wまたはそれ以上の濃度で、好ましくはその化合物を1% w/wを超える濃度で含むように製剤化される。sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインなどの活性成分は、一度に投与することができる、または間をおいて投与される数回分の少用量に分割することができる。治療の正確な用量および期間は、治療されている疾患の働きによっており、周知の試験手順を利用して実験的にまたはインビボもしくはインビトロの試験データからの外挿により決定できるということが理解されよう。濃度および用量値は、治療される個人の年齢によっても変化する可能性があるということにも注意すべきである。特定の被験体に対し、特定の投与計画が個人の必要性および製剤を投与しているかまたはその投与を監視している者の専門的な判断にしたがって長期にわたり調整されるべきであるということ、ならびに本明細書に記載の濃度範囲は、単なる例示にすぎず、特許請求される製剤の範囲または用途を限定することを意図するわけではないということがさらに理解されるべきである。

30

40

【0393】

本明細書で提供される化合物は、注射により、例えば、大量注射または持続注入により非経口投与するために製剤化することができる。注射用の製剤は、単位用量剤形で、例えば、アンプル中にまたは複数回使用容器中に、保存剤の添加とともに供与することができる。その組成物は、油性または水性媒体中の懸濁液、溶液または乳濁液とすることができる、それは懸濁化剤、安定化剤および/または分散化剤などの処方剤(formulatory agent)を含むことができる。あるいは、その活性成分を使用前に適当な媒体、例えば、発熱性物質

50

なしの滅菌水またはその他の溶媒で再構成するように粉末状にすることができる。例えば、500~500,000単位などの、有効な量のsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを安定化溶液中にまたは凍結乾燥形態で含んだ非経口製剤が本明細書で提供される。

【0394】

その化合物を微粒の(micronized)もしくはその他の適当な形態に懸濁させることができ、またはこれを誘導体化してさらに溶解性の高い産物とするかもしくはプロドラッグとすることができる。得られる混合物の形態は、意図する投与方法および選択の担体または媒体中での化合物の溶解性を含めて、いくつかの要因に依存する。その有効濃度は病状の症状を改善するのに十分なものであり、これは実験的に決定することができる。

10

【0395】

3. 凍結乾燥粉末

同様に本明細書で提供されるのは、投与のために溶液、乳濁液およびその他の混合物として再構成できる、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを含む凍結乾燥粉末である。これらの製剤は、固体またはゲルとして再構成し製剤化することもできる。

【0396】

無菌の、凍結乾燥粉末は、sHASEGPもしくはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの固形分を適当な溶媒中に溶解することによりまたはsHASEGPもしくはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを含む溶液の一定分割量を適当な溶媒中で混合することにより調製される。その溶媒は、安定性を向上させる賦形剤またはその粉末もしくは粉末から調製した再構成後の溶液の他の薬理成分を含むことができる。使用できる賦形剤としては、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース、ラクトースまたは適当なその他の作用物質が挙げられるが、これらに限定されることはない。その溶媒は同様に、クエン酸緩衝液、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カルシウム緩衝液または当業者に知られる、通常は、pHがほぼ中性の他のそのような緩衝液などの緩衝液を含むことができる。続けてその溶液を滅菌ろ過し、その後、当業者に知られる標準的な条件下で凍結乾燥することによって、凍結乾燥製剤が得られる。一般に、滅菌ろ過によって生ずる溶液を凍結乾燥のためにバイアル中に分注する。各バイアルは、化合物を10~1000mgもしくは100~500mgなどの単回用量でまたはそれを複数用量で含むことができる。

20

30

【0397】

簡単に言えば、凍結乾燥粉末は、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース、ラクトースまたは適当なその他の作用物質をクエン酸緩衝液、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カルシウム緩衝液または当業者に知られる、pHがほぼ中性の他のそのような緩衝液などの適当な緩衝液中に約1~20%溶解することにより調製する。次いで、得られた混合液に約30~35 などの室温を超える温度で、例えば、sHASEGPのナトリウム塩などの選択の塩(およそ塩1gm/緩衝溶液10~100gm、通常は1gm/30gm)を添加し、その塩が溶解するまで攪拌する。得られた混合液をさらなる緩衝液の添加により希釈して、得られる塩濃度を約10~50%、通常は約15~25%に低下させる。得られた混合液を無菌的にろ過するかまたは処理して微粒子を除去しおよび無菌性を確保し、凍結乾燥のためにバイアル中に分注する。凍結乾燥粉末は、約4 から室温でなどの、適した条件の下で保存することができる。

40

【0398】

この凍結乾燥粉末を注射用蒸留水で再構成することにより、非経口投与で用いる製剤が得られる。再構成の場合、sHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを含む凍結乾燥粉末の治療有効量は、滅菌水または適当なその他の担体1ミリリットルあたりとして加えておく。その正確な量は選択の化合物に依存するものであり、当業者に知られる方法により実験的に決定することができる。

【0399】

50

4. 局所外用投与

局所外用混合物は、局所性および全身性投与について記述しているように調製する。得られる混合物は溶液、懸濁液、乳濁液または同様のものとして行うことができ、これをクリーム剤、ゲル剤、軟膏剤、乳剤、溶剤、エリキシル剤、ローション剤、懸濁剤、チンキ剤、ペースト剤、泡状物質、エアロゾル、洗浄剤、噴霧剤、坐剤、絆創膏、皮膚貼布剤または局所外用投与に適したその他の任意の製剤として製剤化する。

【0400】

sHASEGPもしくはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインまたはその薬学的に許容される誘導体の組成物は、吸入によるような、局所外用適用するためのエアロゾルとして製剤化することができる(例えば、U.S. Patent No. 4,044,126、4,414,209、および4,364,923を参照されたい。これらの米国特許は、炎症性疾患、特に喘息の治療に有用なステロイドを送達するためのエアロゾルについて記述している)。これらの製剤は気道に投与するため、噴霧吸入器用のエアロゾルもしくは溶剤の形態で、または注入用の超微粒粉剤として、単独もしくはラクトースのような不活性担体とともに存在することができる。そのような場合、製剤の粒子は通常、10ミクロン未満など、50ミクロン未満の直径を有する。

【0401】

吸入による投与の場合、本明細書で用いる組成物は、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素および適当なその他のガスを含むがこれらに限定されない、適当な噴射剤の使用とともに、加圧包装のエアロゾル噴霧器による押し出しまたは噴霧吸入器の形式で送達することができる。加圧エアロゾルの場合、その単位用量は、ある計量された量を送達するバルブの供与により判定することができる。吸入器または注入器で用いる、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物とラクトースまたはデンプンなどの適当な粉末基剤との混合粉体を含むように製剤化することができる。

【0402】

その組成物は、ゲル剤、クリーム剤、およびローション剤の形態で、皮膚および眼内などの粘膜に局所外用適用するためならびに眼に適用するためあるいは嚢内または髄腔内に適用するためなど、局所または局所外用的に適用するために製剤化することができる。局所外用投与は経皮的送達を企図するものであり、これは同様に眼または粘膜に投与することを企図するものであり、あるいは吸入療法を企図するものである。活性化合物の点鼻液を単独でまたはその他の薬学的に許容される賦形剤とともに投与することもできる。

【0403】

例えば、皮膚にまたは眼に局所外用適用するのに適した製剤は一般に、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、ペースト剤、ゲル剤、噴霧剤、エアロゾル、および油剤として製剤化されている。使用できる担体としては、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、およびその二つまたはそれ以上の組み合わせが挙げられる。この局所外用製剤はさらに好都合には、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(アルキレングリコール)、ポリ/ヒドロキシアルキルメタクリレートまたはポリメタクリルアミドを含むがこれらに限定されない増粘剤を0.05~15重量パーセント含むことができる。局所外用製剤は、滴注によりまたは結膜嚢内に軟膏として適用されていることが多い。これを眼の洗浄または潤滑用に、顔面の瘻孔(facial sinus)および外耳道用に使用することもできる。液状の局所外用製剤を親水性の三次元高分子マトリクス中に、ストリップ(細片)、コンタクトレンズ、および同様のものの形態で存在させることもでき、そのマトリクスから活性成分を放出させる。これを前眼房およびその他の場所に注入することもできる。例えば、本明細書で提供されるのは、粘弾性物質の注射後に眼内で使用する、有効量のsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインの安定化溶液、例えば、特異活性30~150,000単位/mgのその可溶性糖タンパク質1~5000単位の5~50 μlなどの少容量の溶液を含有する製剤である。

【0404】

これらの溶液、特に眼科用途を対象としたものは、適当な塩の入った、pH約5~7の0.01%~10%等張液として製剤化することができる。

【0405】

5. その他の投与経路用の組成物

局所外用適用、経皮貼布、および直腸投与などの、その他の投与経路が同様に本明細書で企図される。

【0406】

例えば、直腸投与用の医薬剤形は、全身的な効果を目的とした直腸用の坐剤、カプセル剤および錠剤である。直腸用の坐剤とは、直腸内に挿入される固形物であって、体温で溶解するかまたは軟らかくなって一つまたは複数の薬理的にまたは治療的に活性な成分を放出する固形物を指すように本明細書で使用される。直腸用の坐剤に利用される薬学的に許容される物質は、基剤または媒体および融点を上昇させる作用物質である。基剤の例としては、カカオバター(カカオ脂)、グリセリン-ゼラチン、カーボワックス(ポリオキシエチレングリコール)ならびに脂肪酸のモノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドの適当な混合物が挙げられる。各種の基剤を組み合わせることができる。坐剤の融点を上昇させる作用物質としては、鯨ろうおよびワックスが挙げられる。直腸用の坐剤は、圧縮法によりまたは成型法により調製することができる。直腸用の坐剤の典型的な重量は、約2から3gmである。

10

【0407】

直腸投与用の錠剤およびカプセル剤は、先と同じ薬学的に許容される物質を用い、経口投与用の製剤に対するのと同じ方法により製造される。

20

【0408】

経皮投与に適した製剤は、長時間にわたって、受容者の表皮と密着したまま留まるように適合させた別個の貼布剤として供与することができる。このような貼布剤は、活性化合物に対する濃度が、例えば、0.1から0.2Mの随意緩衝性水溶液として活性化合物を含むことが好ましい。経皮投与に適した製剤は同様に、イオントフォーシス(例えば、Pharmaceutical Research 3 (6): 318 (1986)を参照されたい)により送達することができ、これは典型的に、その活性化合物の随意緩衝性水溶液という形をとることができる。

【0409】

薬学的組成物は同様に、放出制御手段および/または送達装置により投与することができる

30

(例えば米国特許Nos. 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770;

3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566;

5,591,767; 5,639,476; 5,674,533および 5,733,566を参照されたい)

。その活性化合物または薬学的に許容される誘導体は、化合物が体内から直ぐに除去されてしまうことを防ぐ、持続放出性の製剤またはコーティングのような、担体とともに調製することができる。

【0410】

40

本明細書で提供される組成物および方法の一つの実施形態では、治療薬を持続放出性の送達媒体中で局所的に投与する。例えば、治療薬をコロイド分散系中または高分子安定化結晶中に封入する。有用なコロイド分散系としては、ナノカプセル、ミクロスフィア、ビーズ、ならびに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含めた脂質に基づく系が挙げられる。例えば、そのコロイド分散系はリポソームまたはミクロスフィアとすることができる。リポソームは人工膜小胞であり、これは注入時にまたは移植時に持続放出性の送達媒体として有用である。脂質-高分子複合体およびリポソームのいくつかの例がU.S. Patent No., 5,631,018に開示されており、これはその全体が参照として本明細書に組み入れられる。持続放出性の送達媒体のその他の例は、生分解性ヒドロゲルマトリックス(U.S. Patent No. 5,041,292)、 dendritic 高分子複合体(U.S. Patent No

50

5,714,166)、および多小胞リポソーム(Depofoam(登録商標), Depotech, San Diego, CA) (U.S. Patent No. 5,723,147および5,766,627)である。局所(例えば、皮下組織内への)注入用の治療薬を封入するのに適したマイクロスフィアの一つのタイプは、D. Fletcher, Anesth. Analg. 84: 90-94, (1997)に記述されているような、ポリ(D, L)ラクチドのマイクロスフィアである。例えば、1から5000単位/mlなどの有効量のsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインを含有する持続放出性製剤は、化粧品処方および脊髄損傷の治療を含むがこれらに限定されない、さまざまな用途のためにまたはさまざまな病状を治療するために利用することができる。

【0411】

10
 所望の血中濃度は、血漿濃度により確定される活性物質の持続注入により維持することができる。主治医は、毒性、または骨髄、肝臓もしくは腎臓の機能不全が理由で投与量を低下させるために治療法を打ち切る、中断するまたは調整する方法およびタイミングを承知しているはずであるということに留意されたい。反対に、主治医は、臨床反応(有害な副作用を除いて)が十分ではない場合に治療をさらに高い水準に調整する方法およびタイミングも承知しているはずである。

【0412】

20
 sHASEGPポリペプチドおよび/またはその阻害剤の有効性および/または毒性は、単独でまたは治療的に有効な薬剤などの他の薬剤とともに、当技術分野において知られる方法により評価することもできる(例えば、O & Apos; Reilly, Investigational New Drugs 15: 5-13 (1997)を参照されたい)。

【0413】

6. 製品

sHASEGPポリペプチドもしくはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメインまたは前記の作用物質のいずれかを含む組成物は、包装材料であって、本明細書で企図される疾患または障害の治療に有効な、本明細書で提供される化合物またはその適当な誘導体をその包装材料に入れたもの、および化合物またはその適当な誘導体が本明細書で企図される疾患または障害を治療するためのものであることを表示するラベルを含む製品として包装することができる。そのラベルは、治療が保証される障害を任意で含むことができる。

【0414】

30
 本明細書で提供される製品は、包装材料を含む。医薬品の包装に用いる包装材料は、当業者によく知られている(例えば、U.S. Patent No. 5,323,907、5,052,558および5,033,352を参照されたい)。医薬包装材料の例としては、プリスター包装、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、注射器、ボトル、ならびに選択の製剤および対象とする投与方法や治療に適した任意の包装材料を含むが、これらに限定されることはない。本明細書で提供される化合物および組成物の多様な製剤を企図するものであり、HC V感染がその症状または原因の介在物質または起因物質として関与しているあらゆる障害に対する各種の治療も企図するものである。

【0415】

40
 組成物および/またはその投与のための使用説明書との組合せを含むキットも本明細書で提供される。キットはさらに、その複合物を注射するために、通常は無菌形態で包装した注射針もしくは注射器、ならびに/または包装したアルコールパッドを含むことができる。使用説明書は、臨床医がまたは患者が活性物質を投与するために任意で含まれる。例えば、本明細書で提供されるのは、有効量のsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメイン、例えば、1~5000単位のもの可溶性糖タンパク質を容量5~50µl中に入れた少容量の注射器を含むキットであり、任意で粘弾性物質が入った第二の注射器を含むそのキットである。同様に本明細書で提供されるのは、有効量のsHASEGPまたはその可溶性ヒトヒアルロニダーゼドメイン、例えば、1~500単位のもの可溶性糖タンパク質、および治療量の第二の活性成分、例えば、薬物、小分子、タンパク質または核酸が入った少容量の注射器を含むキットである。

【0416】

K. 動物モデル

マウスおよびラットを含む齧歯類、ウシ、ニワトリ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ゴリラを含むサル、およびその他の霊長類などのトランスジェニック動物およびトランスジェニック動物が本明細書で提供される。具体的には、sHASEGPポリペプチドをコードする異種核酸を含むヒト以外のトランスジェニック動物あるいはそのポリペプチドの発現が、例えば、内在性遺伝子のプロモーター領域またはその他の調節領域を置換するかまたは改変することにより、変化しているトランスジェニック動物が提供される。このような動物は、例えば、強力なプロモーターの下での発現により、過剰に発現可能となるかまたは異所的に発現可能となるはずの外来性sHASEGP遺伝子と内在性核酸との間の組換えを促進させることにより、相同組換えまたはその他の組換え事象により作製することができる。

10

【0417】

トランスジェニック動物は、マイクロインジェクション法、リポフェクション法およびその他の遺伝子送達法を含むがこれらに限定されない、既知のいずれかの送達法を利用して、核酸を生殖系列細胞または胚性幹細胞などの体細胞に導入することにより作製することができる。典型的には、核酸を胚性幹(ES)細胞などの細胞に導入し、続いてこのES細胞を胚盤胞に注入し、この胚盤胞を仮母に移植する。この後にトランスジェニック動物が誕生する。一般的に動物の染色体への異種核酸分子の導入は、異種sHASEGPをコードする核酸と内在性核酸との間の組換えによって起る。この異種核酸を特定の染色体に標的化することができる。場合によっては、ノックアウト動物を作製することができる。そのような動物は、その染色体中のsHASEGPポリペプチド遺伝子と生物学的に不活性化してある(典型的には異種配列、例えば、抗生物質耐性遺伝子の挿入により)外来性sHASEGPポリペプチド遺伝子との間の相同組換えを促進させることにより最初に作製することができる。一つの実施形態では、この相同組換えは、相同組換えが起るように、挿入的に不活性化されているsHASEGPポリペプチド遺伝子を含むベクターを胚性幹(ES)細胞に形質転換し、続いてこのES細胞を胚盤胞に注入し、この胚盤胞を仮母に移植し、その後にsHASEGPポリペプチド遺伝子が不活性化されているキメラ動物(「ノックアウト動物」)を誕生させることにより行われる(Capecci, Science 244:1288-1292 (1989)を参照されたい)。このキメラ動物を繁殖させてホモ接合ノックアウト動物を作製することができ、次いでこの動物を利用してさらなるノックアウト動物を作製することができる。ノックアウト動物としては、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシ、およびその他のヒト以外の哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されることはない。例えば、ノックアウトマウスが作製される。得られる動物は、sHASEGPポリペプチドの低発現を示す、がんなどの特定の疾患のモデルとして役立つことができる。このようなノックアウト動物は、このような疾患の動物モデルとして、例えば、このような疾患または障害を治療するかまたは予防する能力について各分子をスクリーニングするかまたは試験するために利用することができる。

20

30

【0418】

sHASEGPポリペプチドを過剰発現するものを含めて、その他のタイプのトランスジェニック動物も作製することができる。そのような動物としては「ノックイン」動物が挙げられる。この動物は、その正常遺伝子が突然変異体などの変異体、過剰発現型、またはその他の型により置換されている動物である。例えば、齧歯類の内在性遺伝子のような、ある種の遺伝子をヒト由来などの、別の種由来の遺伝子により置換することができる。動物は染色体中の他の部位への非相同組換えにより作製することもでき、これには複数の組込み事象を有する動物が含まれる。

40

【0419】

第一世代のトランスジェニック動物の作製後、キメラ動物を繁殖させてsHASEGPポリペプチドが過剰発現したまたは異所発現したさらなる動物を作製することができる。そのような動物としては、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシおよびその他のヒト以外の哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されることはない。得られる動物は、sHASEGPポリペプチドの過剰発現または異所性発現を示す、がんなどの特定の疾患のモデルとして役立つことができる。このような動物は、このような疾患の動物モデルとして、例えば、

50

このような疾患または障害を治療するかまたは予防する能力について各分子をスクリーニングするかまたは試験するために利用することができる。特定の実施形態では、sHASEGPポリペプチドが過剰発現したまたは異所発現したマウスが作製される。

【0420】

以下の例は、単なる例示を目的として含まれているものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0421】

L. sHASEGPの治療用途

食肉処理場から得られる天然由来のヒアルロニダーゼ酵素が40年以上にわたって臨床用酵素製剤の主要源となってきた。ウシおよびヒツジの睾丸はこの原料の主要源となっている。しかしながら、これらの臨床用酵素製剤はあまり精製されておらず、既知の特異活性30~100,000単位/mgに基づけば、これらは純度0.5~5%の製剤として販売されている。すなわち、これらの製剤が純度を欠いていることは、これらが食肉処理場由来であることと合わせて考えると、これらを、ヒトに対し免疫原性ともおよびクロイツフェルト・ヤコブ病ならびにその他のウシおよびヒツジ病原体の潜在的な供給源ともしている。ウシおよびヒツジのヒアルロニダーゼ製剤に対し、アナフィラキシー反応が起ることが知られている。

10

【0422】

ウシまたは細菌に由来するヒアルロニダーゼが過剰なヒアルロン酸と関係する疾患の治療で使用されており、ならびに生理液および/または治療薬の循環を促進させるためにそれらが使用されている。例えば、ウシヒアルロニダーゼは、眼科手術のために眼球周囲、眼球後およびテノン嚢下ブロックに麻酔と同時に注入することができる。さらに、それが不足していることで、外科合併症が増加している(Brown SM et al. J Cataract Refract Surg. 1999 Sep; 25(9): 1245-9.)。ウシヒアルロニダーゼは、ピンカアルカロイドなどの壊死性物質の静脈傍注射による局所壊死に対する解毒剤としても使用されている(Few, B. J. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26)。ウシ睾丸ヒアルロニダーゼは、ガングリオン嚢胞の治療にも有用である(Paul et al. J Hand Surg 1997 Apr; 22 (2): 19-21)。ヒアルロニダーゼを利用して、皮下注入で流体の皮下送達を促進させることもできる(Berger EY, Am Geriatr Soc 1984 Mar; 32(3): 199-203)。ヒアルロニダーゼは同様に、粘弾性物質を受けている緑内障患者および白内障患者の目の眼圧を低下させるために利用されてきた(1989年4月11日に発行されたU.S. Pat. No. 4,820,516)。

20

30

【0423】

ウシまたは細菌に由来するヒアルロニダーゼは、化学療法薬の活性および/または化学療法薬との腫瘍の接近可能性を高める「展着剤」としても利用されている(Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, abstract no. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45:H.9)。ヒアルロニダーゼとの併用化学療法は、膀胱がん(Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307)、扁平上皮がん(Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297)、乳がん(Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596)、および消化管がん(Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8:391-396)を含めて各種のがんの治療に有効である。ヒアルロニダーゼは、脳腫瘍(神経膠腫)の治療における単独治療薬として有効である(1988年4月7日刊行のPCT公開出願WO88/02261)。ヒアルロニダーゼの投与により、以前には化学療法抵抗性であった脾臓腫瘍、胃腫瘍、結腸腫瘍、卵巣腫瘍、および乳房腫瘍の反応も惹起される(Baumgartner et al., 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al., 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390)。不幸にも、そのようなヒアルロニダーゼにある夾雑物およびヒト以外の性質によって、アナフィラキシー反応が引き起こされている。

40

【0424】

ウシ由来のヒアルロニダーゼは、その間接的な抗がん作用のほかに、直接的な抗発がん作用を有する。ヒアルロニダーゼはマウスに移植された腫瘍の増殖を阻止し(De Maeyer et al., 1992, Int. J. Cancer 51:657-660)、これは発がん性物質暴露後の腫瘍形成を阻

50

害する(Pawlowski et al., 1979, *Int. J. Cancer* 23: 105-109; Haberman et al., 1981, *Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, Washington, D.C., 22:105, abstract no. 415)。

【 0 4 2 5 】

治療法としての、特に化学療法において従来の化学療法薬と併せた治療法としてのウシ由来ヒアルロニダーゼの価値またはそれ自体の化学療法薬としてのその価値を考慮すると、当分野では、実質的に精製されたヒト由来ヒアルロニダーゼの製剤が必要とされている。効率的で、費用効果的なヒアルロニダーゼ作製法が同様に、その酵素を商業的にかなりの量で供与するために必要とされている。本発明はこれらの問題に取り組むものである。

【 0 4 2 6 】

ヒアルロン酸は細胞外マトリクスの必須成分である。ヒアルロン酸は哺乳類の結合組織で見出されており、これは目の硝子体の主要な構成成分である。結合組織では、ヒアルロン酸に結合している水和水が組織間に空隙を作りだし、それによって細胞運動および細胞増殖に役立つ環境を作り出す。ヒアルロン酸は、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, 1991, *Cell Biol. Extracell. Matrix*, Hay (ed), Plenum Press, New

York, 1384-1386; Bertrand et al., 1992, *Int. J. Cancer* 52:1-6; Knudson et al., 1993,

FASEB J. 7:1233-1241)

。さらに、ヒアルロン酸の量は、腫瘍の悪性度と相関している

(Ozello et al., 1960, *Cancer Res.* 20:600-604; Takeuchi et al., 1976, *Cancer*

Res. 36:2133-2139; Kimata et al., 1983, *Cancer Res.* 43:1347-1354)

。

【 0 4 2 7 】

脊髄損傷の後、グリア性瘢痕が星状細胞によって形成される。グリア性瘢痕にはコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が含まれる。CSPGは軸索成長の障害で重要な役割を担っている(Levine, 1994; Powell et al., 1997)。例えば、胎児の発育の間、CSPGは軸索を拒絶し神経細胞の接着を障害する。CSPGは境界形成で重要な役割も担っている(Snow et al., 1990, 1992; Powell and Geller, 1999)。さらに、CSPGの発現は、CNSの損傷後に増加する(McKeon et al., 1991; Davies et al., 1997)。

【 0 4 2 8 】

研究から、CSPGの障害作用は主にコンドロイチン硫酸(CS)、グリコサミノグリカン(GAG)の糖鎖によるものであるということが示唆されている(Snow et al., 1990; Cole and McCable, 1991; Geisert and Bidanset, 1993)。このことは、細菌のコンドロイチナーゼを髄腔内に投与すると、その投与によって実際に軸索の再生が促進されるという発見により支持されている。さらに、電気生理学的実験により、再生された皮質脊髄(CST)索が機能的結合を確立していることが分かった(Bradbury, et al 2002)。その直接的な障害作用のほかに、CSPGは同様に細胞接着分子または神経栄養因子と相互作用して、神経突起伸長に影響を及ぼしている可能性がある(Roberts et al., 1988; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Milev et al., 1994)。哺乳動物の遺伝子組換えヒアルロニダーゼはこのように、グリア性瘢痕においてCSPGの障害を反転させるために、また損傷後の軸索再生を促進させるために有用である。

【 0 4 2 9 】

グリア性瘢痕のCSPGを十分に分解するのに必要とされるsHASEGPの量はさまざまである。場合によっては、その瘢痕のCSPGを除去するのに、髄腔内送達による10~5000単位のsHASEGPの反復投与が必要とされることもある。その他の場合には、持続放出性製剤の使用

10

20

30

40

50

によるsHASEGPの持続放出が好ましいかもしれない。または、sHASEGPをコードする遺伝子治療用ベクターの投与がCSPGの排除を促進させるのに効果的となる場合もある。

【0430】

sHASEGPは化学的髄核分解として知られる椎間板ヘルニアの治療にも有用とすることができる。コンドロイチナーゼABC、およびsHASEGPと類似の基質を切断する酵素は、腰椎中の椎間板内圧の低下をもたらすことができる(Sasaki et al., 2001, Ishikawa et al., 1999)。椎間板損傷には三つのタイプがある。突出型の椎間板(損傷)は、原型を保っているがしかし膨隆しているものである。脱出型の椎間板(損傷)では、線維輪(fibrous wrapper)が破れており、髄核(NP)は漏出しているものの、依然として椎間板に結び付いている。遊離脱出型の椎間板(損傷)では、NPの断片が椎間板から脱出しており、これが脊椎管中に遊離して存在している。化学的髄核分解は、突出型および脱出型の椎間板(損傷)には効果があるが、しかし遊離脱出型の椎間板損傷には効果がない。米国では、化学的髄核分解は腰椎(下部)に用いる場合にのみ承認されている。その他の国々では、それは頸椎(脊椎上部)ヘルニアを治療するのに成功裏に利用されている。化学的髄核分解はすなわち、椎間板圧を低下させることが好ましい場合、椎間板手術に代わる従来手段となっている。

10

【0431】

糖タンパク質の糖鎖の正確な組成および構造は、その血清中半減期に直接的に影響を及ぼす可能性がある。これは肝臓および細網内皮系の細胞が特定の糖質を有する循環性の糖タンパク質を結合し内在化することができるためである。肝細胞は末端に(すなわち、ポリペプチドに対するグリカンの最外部の末端に)Gal残基があるオリゴ糖鎖を認識する受容体をその表面に有しており、マクロファージは末端ManまたはGlcNAc残基に対する受容体を含んでおり、ならびに肝細胞およびリンパ球は露出性のフコース残基に対する受容体を有している。しかしながら、シアル酸特異的な受容体はこれまでに発見されていない。一般的に、オリゴ糖の空間的な配置にいくぶん依存するが、肝臓および細網内皮系の細胞表面受容体により認識される露出性の糖残基の数が多くなるほど、糖タンパク質は血清からいっそう迅速に排除されることになる。しかしながら、全ての分枝がシアル酸で終結しているかまたは「キャップされている」オリゴ糖は、シアル酸特異的な受容体が存在していないので、そのオリゴ糖が結合しているタンパク質の排除を促進させることはない。

20

【0432】

糖タンパク質のオリゴ糖鎖の存在および性質は、肝臓細胞および細網内皮系細胞の糖特異的な受容体によるその認識のほかに、重要な生化学的性質にも影響を及ぼすことができる。糖タンパク質からその糖質を除去することで、通常、その可溶性が減少することになり、またそうすることで、正しいポリペプチドの折り畳み様式の脱安定化によりおよび/またはプロテアーゼ感受性部位の露出によりタンパク質分解に対するその感受性が高まる場合もある。同じような理由で、タンパク質のグリコシル化状態は、免疫系によるその認識に影響を及ぼすことができる。

30

【0433】

sHASEGPを利用して、低温保存および卵細胞質内精子注入(ICSI)法などの他の体外受精法の前に卵子周囲の卵丘細胞を除去することができる。ヒアルロニダーゼは塩緩衝溶液中で10~200 U/mlとし、回収した卵母細胞に添加することができる。卵母細胞は遊離された卵丘細胞から吸引により分離し、これをヒアルロニダーゼが入っていない培地を用いた数回の洗浄により洗浄する。次いで、その卵子を低温保存またはIVF法のために処理することができる。

40

【0434】

sHASEGPは化学療法薬を固形腫瘍中にいっそう効果的に透過させるのにも有用である。sHASEGPは抗がん剤とともに腫瘍内に注入してもよくあるいは播種性のがんまたは腫瘍に到達するのが困難である場合、静脈内に注入してもよい。抗がん剤は、化学療法薬、抗体、ペプチド、または遺伝子治療用ベクター、ウイルスもしくはDNAとすることができる。さらに、多培養による(multicultural)薬物抵抗性を獲得しておりこれまでの化学療法に抵抗性の腫瘍において、sHASEGPタンパク質を利用して腫瘍細胞を感受性の循環プールに充

50

ることができる(St Croix et al Cancer Lett 1998 Sep 11; 131(1): 35-44)。sHASEGPは、グリコサミノグリカンを蓄積している腫瘍へのモノクローナル抗体、サイトカインおよびその他の薬物などの生物製剤の送達を促進するのにも有用である。腫瘍の多くは、グリコサミノグリカンの異化に關与する遺伝子を欠失しており、それによる局所的な蓄積は、抗腫瘍薬および免疫系が腫瘍に到達することを妨害している可能性がある。

【0435】

sHASEGPを利用して、従来の化学療法に抵抗性を示す腫瘍の感受性を高めることもできる。一つの実施形態では、sHASEGPをLuCa-1欠損と關係する腫瘍がある患者に、腫瘍部位周辺での拡散を増加させるために(例えば、化学療法因子の循環を増加させるために(例えば、腫瘍部位の内外での化学療法薬の循環および/または濃度を促進させるために))、腫瘍細胞の運動を阻害する(例えば、HA分解により)ためにおよび/または腫瘍細胞をアポトーシスの閾値に下げる(すなわち、腫瘍細胞をアノイキスの状態、つまり腫瘍細胞を、細胞死を促進できる、好ましくはアノイキスにある細胞のプログラム細胞死を選択的に促進できる化学療法薬またはその他の薬剤の作用にいつそう感受性とさせる状態にする)ために有効な量で投与する。本明細書では、化学療法薬とは、腫瘍細胞増殖の阻害を促進させる、好ましくは腫瘍細胞死を促進させる、より好ましくは腫瘍細胞死を選択的に促進させる、天然由来(例えば、腫瘍壊死因子、IF)によるのみならず合成(例えば、シスプラチン)にもよる、全ての分子を包含することを意図する。

10

【0436】

特に対象としているのは、非がん性(正常)細胞と比べてヒアルロニダーゼ活性が検出不可にまで低下している、転移性および非転移性がん、特に転移性がんの治療のためのsHASEGPの使用である。sHASEGPは各種のがんのいずれか、特に浸潤性腫瘍の治療で化学療法薬として(単独でまたはその他の化学療法薬との併用で)使用することができる。例えば、sHASEGPは、肺小細胞がん、肺扁平上皮がん、ならびに乳がん、卵巣がん、頭頸部がん、またはヒアルロニダーゼの量の低下と關係するもしくは欠陥のあるLuCa-1(hpHase)遺伝子(例えば、十分なhpHase量の発現を与えられないLuCa-1遺伝子または十分なヒアルロニダーゼ活性のレベルを与えられない欠陥性のhpHaseをコードするLuCa-1遺伝子)と關係するその他の任意のがんあるいはヒアルロニダーゼの異化の減少と關係するその他の欠陥の治療で利用することができる。sHASEGPは、分解を起こすのに細胞の關与を必要としないので、欠陥性のHA異化と關係する悪性腫瘍の治療に好ましい。

20

30

【0437】

当業者は、投与に適した具体的な用量を上で論じた各要因にしたがって容易に決定することができる(例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, 11th Ed., 1987を参照されたい)。さらに、ヒトに適した用量の見積もりは、インビトロでのsHASEGPの酵素活性レベルの測定および/または動物実験で有効な用量から外挿することができる。例えば、70~300 TRUのヒアルロニダーゼは、scidマウスに負荷した腫瘍を減少させるのに効果的である。この情報を考慮すると、平均的な70kgのヒトに対応する用量は、約250,000~1,200,000 TRUのヒアルロニダーゼとなるはずである。ヒトの患者に投与されるsHASEGPの量は一般に、酵素活性1 TRUから5,000,000 TRUの範囲、好ましくは約1,000 TRUから2,500,000 TRUの間、より好ましくは約100,000 TRUから1,500,000 TRUの間、通常は約250,000 TRUから1,200,000 TRUの間であり、約725,000 TRUが平均的な処方量に相当する。

40

【0438】

一つの実施形態では、sHASEGPは、約150,000 TRU/ccの濃度でsHASEGPを含有する0.15M食塩水として製剤化する。次いで、この製剤を15,000 TRU/患者の体重kgで静脈注射する。または、この酵素製剤を皮下注射して、ヒアルロニダーゼを腫瘍部位周辺に灌流させることもできる。好ましい実施形態では、sHASEGPを腫瘍周辺にまたは腫瘍中に注射する。別の好ましい実施形態では、sHASEGPをリポソームとして製剤化し、これを静脈内にまたはLuCa-1(hpHase)遺伝子の欠陥と關係するがん性細胞の部位にもしくはその部位の近傍に注射することにより送達する。sHASEGPを静脈内に注射することで、sHASEGPを腫瘍部位にもたらず。さらに、高シアル化sHASEGPは、sHASEGPの末端シアル酸が、細網内皮系によ

50

る循環系からのその酵素の排除を阻止するという点で非経口投与に好ましい。高シアル化 sHASEGP をシアル化されていないウシおよびヒツジヒアルロニダーゼと比較することで、実質的により好ましい薬物動態が達成されることが明らかになる。

【0439】

遺伝子治療の円滑化

ほとんどの遺伝子送達媒体のインビボでの効果は、インビトロで見られる効果と一致していない。グリコサミノグリカンは、多くの細胞型へのDNAおよびウイルスベクターの導入および拡散を妨げている可能性がある。そのような細胞外マトリクス物質の量によって、そのプロセスがかなり妨げられている可能性がある。Dubenskyら(Proc Natl Acad Sci U S A 1984 Dec;81(23):7529-33)により、ヒアルロニダーゼはコラゲナーゼと組み合わせると、インビボでのDNAの形質導入を促進できることが実証された。アデノ随伴ウイルスもヒアルロニダーゼを介した遺伝子治療に適していることがFavreら(Gene Ther 2000 Aug;7(16):1417-20)によって実証されている。

10

【0440】

本発明者らは、細胞外マトリクス中の規定のサイズのチャンネルがsHASEGPで開口されることを本明細書で説明した。これらの細孔は、直径が約200~500nmを超える物質の拡散を促進させることはない。しかし、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびDNA複合体などの小さな分子は、sHASEGPを介した拡散に適している。

【0441】

または、ウイルスにsHASEGP遺伝子を備え付けて、例えば、標的組織内部でのその複製および拡散を促進させることができる。その標的組織は、ウイルスが腫瘍内部で選択的に複製できるがん組織とすることができる。そのウイルスは、ウイルスが組織特異的プロモーターの下で選択的に複製する非溶菌性ウイルスとすることもできる。ウイルスが複製するときに、sHASEGPがウイルス遺伝子と同時に発現することで、インビボでのウイルスの拡散が促進されることになる。

20

【0442】

あるいは、対象とする核酸およびsHASEGPは、同時にもしくは連続的にまたは長期にわたり互い違いとされるように使用することができる。同時にとは、同時投与を指す。この場合には、これらの二種の必須成分を投与前に混合して組成物を形成させることができ、またはそれらを細胞もしくは宿主生物に同時に投与することができる。本発明による組合せ品のどちらの成分が最初に投与されるかに関係なく、それらを連続的に、すなわち順々に投与することも可能である。最後に、長期にわたり互い違いとされるかまたは間欠性とされ且つ規則的でもまたは規則的でなくてもよい間隔で停止され再開される投与方法を使用することが可能である。この二成分の投与の経路および部位は異なってもよいことが指摘される。ある特に好ましい実施形態によれば、sHASEGPを対象の核酸に先立って投与し、その二成分の投与経路を同様とすることが好ましい。各注入の間の時間間隔は決定的に重要な意味を持つわけではなく、これは当業者により定義されることができる。10分から72時間までの間隔、好都合には30分から48時間までの間隔、好ましくは1時間から24時間までの間隔および、非常に好ましくは1時間から6時間までの間隔を推奨することが可能である。

30

40

【0443】

さらに、本発明による組合せ品は、核酸の投与を向上させることを目的とする一種または複数種の分子と組み合わせることもできる。この分子は、核酸に対する保護(細胞中での分解に対する保護)作用を有する分子、宿主細胞中でのその透過もしくはその発現を向上させる分子(融合性ペプチド、核移行シグナルなど)、ある特定の細胞型を標的化可能とする分子(細胞表面タンパク質を認識するリガンドまたは抗体など)、または治療効果を引き延ばす分子(免疫抑制剤など)とすることができる。その組合せ品は、トランスフェクションを容易とする作用物質(タンパク質など)と組み合わせることもできる。

【0444】

本発明による組合せ品は、局所もしくは非経口投与を目的としてまたは消化経路による

50

投与を目的として調製することができる。具体的に言及できる経路は、胃内経路、皮下経路、心臓内経路、静脈内経路、腹腔内経路、滑液嚢内経路、腫瘍内経路、肺内経路、鼻腔内経路および気管内経路ならびに、さらに具体的には、筋肉内経路である。この投与は、単回用量としてまたは特定の時間間隔の後に一回もしくは数回繰り返される用量として、当分野のいずれかの技術(注射、経口経路、煙霧、点滴注入など)を用いて達成することができる。投与経路は、導入される対象遺伝子および治療される疾患に適應するように調整することができる。その製剤は、薬学的に許容される媒体(賦形剤、補助剤など)を含むことができる。細胞外マトリクスの破壊を引き起こす物質および対象とする核酸は、製薬学的用途に適している緩衝液であって、高張性、低張性または等張性とできる緩衝液に溶解されることが好ましい。種々の緩衝液を想定することができる。実例として言及できるものは、生理食塩水(0.9% NaCl)、非生理食塩水(1.8% NaCl)、ヘペス-リングル(Hepes-Ringer)液、乳酸-リングル(Lactate-Ringer)液、Tris-HCl (10mM Tris-HCl、pH7.5~8、1mM EDTA; 10mM Tris-HCl、pH7.5~8、1mM MgCl₂)に基づく緩衝液、リン酸緩衝液(Krebsリン酸-H₂O緩衝液)、糖(グルコース、スクロース、トレハロースなど)溶液、または単純に水である。

10

【0445】

皮下注入

皮下注入、つまり液体を皮下に注入することは、低度から中等度の脱水状態になっている成人患者、特に高齢者に適した有用で簡便な水分補給法である。この方法は安全と考えられ、それが何らかの深刻な合併症をもたらすことはない。最も頻度の高い副作用は軽度の皮下浮腫であり、これは局部マッサージまたは全身性の利尿薬により治療することができる。約3 Lを別々の2部位に24時間周期で投入することができる。よく用いられる注入部位は胸部、腹部、大腿部および上腕部である。好ましい溶液は生理食塩水であるが、半生理食塩水、グルコース入り生理食塩水または5%グルコースなどの他の溶液を使用することもできる。必要に応じて、塩化カリウムをその溶液バッグに添加することができる。さらに、その他の薬物を類似の経路により送達することができる。ヒトsHASEGPを添加して、水分の吸収を促進させることおよび全体的な投与速度を高めることができる。ヒトsHASEGPは食肉処理場由来の酵素と比べて、そのウシ酵素が免疫原性であることが知られているのと同様に免疫原性であるという可能性が低いという点で、反復の皮下注入に好ましい。それは家族または看護婦により自宅で投与されてもよい; その技術はすべての家庭医に知られているはずである。

20

30

【0446】

外来患者の場合、皮下注入部位としては、腹部、胸郭上部、胸上部、肋間隙上方および肩甲部が挙げられる。寝たきりの患者の場合、好ましい部位は、大腿部、腹部および上腕部の外面である。注入セットは合併症もなく、かなり長い期間留置されているが、1日から4日後、注射針および管を交換するべきである。最初の午前の注入前に皮下部位に150UのsHASEGPを投与して、1日に3回1時間または2時間にわたり500mLの大量瞬時投与を行うこともできる。

【0447】

治療用注射の円滑化

経皮的に注射される分子の多くは、ゆっくりとまたは非常に低い効率で循環系に到達する。いくつかの要因が皮下に(SC)または筋肉内に(IM)注射される分子の薬物動態学および薬物動力学を調節している。一般に、大きな分子ほど循環系に能動輸送されずに、いっそうゆっくりといっそう低い効率で循環系に到達する。皮下での生体利用効率は、SC投与の濃度曲線下面積対静脈内投与の濃度曲線下面積の比(AUC_{SC}/AUC_{静脈内})を計算することにより決定される。第二の要因は、電荷および皮下に分子を隔離するのに関与できるマトリクス分子に対する親和性である。これらの物質が局所的に分解される場合、それらは、その所望の標的に決して到達することができず、したがって、標的臓器に対し全体的な全身生体利用効率の低下を示すものである。

40

【0448】

50

大きなタンパク質は、通常、その薬剤が血流中で直接的に利用可能となるように静脈内に投与される。しかしながら薬剤を皮下に、筋肉内にまたは皮内に投与できる場合、患者にとってこれらの投与剤形はずっと扱い易いので好都合であろう。特に、薬剤を一生の間ずっと規則的に摂取しなければならない場合および患者が子供であるときに治療を早期に、今すぐに始めなければならない場合。しかしながら、170から300kDaの凝固第VIII因子などの非常に大きくて不安定な分子の薬剤は、皮下に、筋肉内にまたは皮内に投与される場合、その取り込みが十分ではなく分解が激しいので、通常は生体利用効率が非常に低い。

【0449】

皮下に投与される生物剤の多くの生体利用効率を高める必要性のほかに、いっそう迅速な薬物動態が救急医療の場合には非常に重要でもある。多くの患者では静脈ラインに達するのに必要とされる時間によって、全身投与されないと即効性のない薬物が利用されなくなっている可能性がある。場合によっては、静脈ラインに達することができず、その後皮下注射を行い、このことが標的臓器に達するのにさらなる遅れをもたらしてしまう。したがって、皮下用薬物のいっそう迅速な生体利用効率は、静脈ラインを得るのに必要とされる時間という危険を冒すよりも治療の第一線として有益であろう。皮下にならびに静脈内に送達できる分子の例としては、エピネフリン、アトロピン、ナルカン(narcan)、リグノカイン、およびデキストロースが挙げられる。

10

【0450】

経皮的に注射される分子の多くは、ゆっくりとまたは非常に低い効率で循環系に到達する。いくつかの要因が皮下に(SC)または筋肉内に(IM)注射される分子の薬物動態学および薬物動力学を調節している。一般に、大きな分子ほど循環系に能動輸送されずに、いっそうゆっくりといっそう低い効率で循環系に到達する。皮下での生体利用効率は、SC投与の濃度曲線下面積対静脈内投与の濃度曲線下面積の比($AUC_{SC}/AUC_{静脈内}$)を計算することにより決定される。第二の要因は、電荷および皮下に分子を隔離するのに関与できるマトリクス分子に対する親和性である。これらの物質が局所的に分解される場合、それらは、その所望の標的に決して到達することができず、したがって、標的臓器に対し全体的な全身生体利用効率の低下を示すものである。

20

【0451】

大きなタンパク質は、通常、その薬剤が血流中で直接的に利用可能となるように静脈内に投与される。しかしながら薬剤を皮下に、筋肉内にまたは皮内に投与できる場合、患者にとってこれらの投与剤形はずっと扱い易いので好都合であろう。特に、薬剤を一生の間ずっと規則的に摂取しなければならない場合および患者が子供であるときに治療を早期に、今すぐに始めなければならない場合。しかしながら、170から300kDaの凝固第VIII因子などの非常に大きくて不安定な分子の薬剤は、皮下に、筋肉内にまたは皮内に投与される場合、その取り込みが十分ではなく分解が激しいので、通常は生体利用効率が非常に低い。

30

【0452】

皮下に投与される生物剤の多くの生体利用効率を高める必要性のほかに、いっそう迅速な薬物動態が救急医療の場合には非常に重要でもある。多くの患者では静脈ラインに達するのに必要とされる時間によって、全身投与されないと即効性のない薬物が利用されなくなっている可能性がある。場合によっては、静脈ラインに達することができず、その後皮下注射を行い、このことが標的臓器に達するのにさらなる遅れをもたらしてしまう。したがって、皮下用薬物のいっそう迅速な生体利用効率は、静脈ラインを得るのに必要とされる時間という危険を冒すよりも治療の第一線として有益であろう。皮下にならびに静脈内に送達できる分子の例としては、エピネフリン、アトロピン、ナロキソン(narcan)、リグノカイン、およびデキストロースが挙げられる。

40

【0453】

本発明のさらなる利益は、注射部位での溶液の圧力および容量に関係する苦痛および罹患なしに、等価なまたはいっそう大きな容量の溶液をSCまたはIMに送達する能力にある。

50

【0454】

硝子体出血

硝子体切除術の実施中に、網膜のさらなる剥離または断裂を起こす可能性を最小限にするため、硝子体に、プロテアーゼを含有しないある種のグリコサミノグリカナゼ酵素類を注射して、硝子体を除去する前に、硝子体を網膜から分離または「離断」させることが、U.S. Pat. No. 5,292,509 (Hageman)に既に提案されている。硝子体のこのような離断または分離は、硝子体を除去する際に網膜のさらなる断裂または剥離が起こる可能性を最小限にすることを目的としている。この硝子体の離断を意図的に達成するため使用できる、プロテアーゼを含有しない具体的なグリコサミノグリカナゼ酵素類の例としては、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼAC、コンドロイチナーゼB、コンドロイチン4-スルファターゼ、コンドロイチン6-スルファターゼ、ヒアルロニダーゼおよび -グルクロニダーゼがある。

10

【0455】

ヒアルロニダーゼ酵素は、U.S. Pat. No. 5,292,509 (Hageman)に記載されている硝子体切除法に付随する用途を含む各種の眼科の用途に使用できることは知られているが、以前に発表された研究結果は、ヒアルロニダーゼ酵素はそれ自体が眼球の網膜および/または他の解剖学的構造体に対して毒性であることを示している。「The Safety of Intravitreal Hyaluronidase」; Gottlieb, J. L.; Antoszyk, A. N., Hatchell, D. L.およびSoloups, P., Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 11, 2345-52 (1990)を参照されたい。さらに、不純物を含んだ食肉処理場由来のヒアルロニダーゼ製剤を使用することで、眼のブドウ膜炎または炎症を引き起こされる可能性がある。したがって、ヒトsHASEGPを使用することは、そのさらに高い効力、純度という点でも反復投与後の免疫原性反応や抗体が介する中和反応を引き起こす可能性がある動物起源がないという点でも好ましい。別の実施形態では、ペグ化型のsHASEGPを眼の中に注射することができる。そのようなペグ化されたsHASEGPは、硝子体からそれほど急速に排除されてしまうことはなく、長時間にわたって硝子体中でその活性を維持する。

20

【0456】

いくつかのヒアルロニダーゼ製剤が眼に対し有害であることは、他の研究者らが確認しており、彼らは、そのようなヒアルロニダーゼ製剤を、動物の毒性モデルの眼球に血管新生を実験的に誘発する毒性刺激薬として使用することを提案している(「An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit」; Antoszyk, A. N., Gottlieb, J. L., Casey, R. C., Hatchell, D. L.およびMachemer, R., Invest Ophthalmol Vis Sci 32:1, 46-51 (1991)を参照されたい)。眼球内処置には、水銀に基づくおよびウシまたは細菌に由来する混入物がない高精製sHASEGPを使用することが好ましい。さらに、組換えヒトsHASEGPは食肉処理場由来の製剤と比べて、ウシ病原体がない純度であるという点でも免疫原性の危険が低下しているという点でも好ましい。最も好ましくは、ペグ化sHASEGPが想定される。

30

【0457】

したがって、ヒトsHASEGPを用いる酵素的方法が哺乳類の眼の眼科疾患を治療するために提供される。本発明の一つの実施形態では、そのsHASEGPをペグ化して、硝子体内でのその滞留を持続し限局性の摂取を防止する。血管新生の阻止、および硝子体からの網膜に有害な物質の排除率の増加は、眼に毒性障害を引き起こすことなく、処置する眼の硝子体液を液化するのに有効な量のヒアルロニダーゼを投与することにより達成される。硝子体液の液化化によって、硝子体眼房からの液体の交換率が増大する。この交換(率)の増大によって、存在することで眼科的損傷および網膜損傷を引き起こす物質および条件がなくなる。

40

【0458】

sHASEGPの化粧品用途

ヒアルロニダーゼには、結合水の保持に関与する、主物質の長いムコ多糖鎖を脱重合化する効果や毛細血管の圧縮により、代謝老廃物を排除する有機液体の拡散を減速化する効

50

果があることが知られている。脂肪細胞の脂肪過負荷に関連してそのように水および老廃物を保持してしまうことが、古典的な「豚皮状」浮腫または「橙皮状」浮腫の構成要素となっている。したがって、この脱重合化により長いムコ多糖鎖が短い鎖に切断されることになり、そこから結合水の排除、老廃物の排除、静脈およびリンパ循環の回復ならびに局所浮腫の消失が起こる。

【0459】

したがって、sHASEGPを皮下投与により使用することは、いわゆるセルライトの蓄積に関与するグリコサミノグリカンを除去するのにおよびリンパ液の流れを促進させるのに好ましい。ヒトsHASEGPは、これが食肉処理場に由来するタンパク質の炎症成分なしで前記のグリコサミノグリカンを除去できるという点で、およびこれが高純度のものであること
10
や免疫原性になる可能性が低いという点でセルライトを治療するのに好ましい。sHASEGPを反復の皮下注射により、軟膏剤もしくはクリーム剤の形態での経皮的送達によりまたは注射可能な持続放出性製剤の使用により投与して、グリコサミノグリカンの継続的分解を促進させることやその再発を予防することができる。

【0460】

臓器移植

ヒアルロナンは、部分的にその分子サイズに関連したいくつかの生物学的作用を有する(West, D.C., Kumar, S. Exp.Cell. Res. 183, 179-196, 1989)。臓器中のヒアルロナンの含量は、その臓器の炎症の異なる症状で増大することが示されている。したがって、ヒアルロナン濃度の増大は、肺炎(Nettelbladt O et al, Am Rev Resp Dis 1989; 139: 7
20
59-762)および心筋梗塞(Waldenstrom et al, J Clin Invest 1991; 88(5): 1622-1628)などの炎症性免疫性損傷の症状を特徴とする異なる臓器からの組織で示されている。その他の例には、腎臓(Ha'llgren et al, J Exp Med 1990a; 171: 2063-2076; Wells et al, Transplantation 1990; 50: 240-243)、小腸(Wallander et al, Transplant Int 1993; 6: 133-137)または心臓(Ha'llgren et al, J Clin Invest 1990b;85:668-673)移植後の同種異系移植片拒絶反応あるいはウイルス性の心筋炎症(Waldenstrdm et al, Eur J Clin Invest 1993; 23: 277-282)がある。

【0461】

臓器移植と関係する間質性浮腫の発症は、移植手術の分野で深刻な問題になっている。移植片の25%もが、その機能を一時的に失うような程度にまで膨張することになる。さら
30
に、この症例の2~3%では、この膨張が腎臓の破壊を引き起こし、その結果、大出血につながる。

【0462】

sHASEGPを利用して臓器移植片に蓄積したグリコサミノグリカンを分解することができる。そのようなグリコサミノグリカンを除去することで、移植片からの水の除去が促進され、故に臓器の機能が促進される。したがって、500~10,000単位/kgに及ぶ用量を投与して間質圧を低下させることができる。

【0463】

脳内のグリコサミノグリカンの病的な蓄積

脳脊髄の病的状態のいくつかで、ヒアルロナンの量は上昇する。脳脊髄のヒアルロナンの量は通常、成人では200 µg/L未満である(Laurent et al, Acta Neurol Scand 1996 Sep
40
;94(3):194-206)。髄膜炎、脊椎管狭窄症、頭部外傷および脳梗塞などの疾患では、これらの量は8,000 µg/Lを超えるまで上昇する可能性がある。したがって、髄腔内送達または過シアル化sHASEGPの全身注射によるsHASEGPの投与を利用して、かなり上昇した基質量を低下させることができる。

【0464】

脳内に有効なリンパ管がないことによって、頭部外傷後に致命的な浮腫に至ることもある。ヒアルロナンの蓄積は、HAシンターゼによる合成の増加、および分解の減少の結果である。ヒアルロナンの蓄積は、損傷組織中の水分含量を増加させて白血球の血管外遊出を促進させるという提案に貢献するものであるが、しかし致命的となる可能性がある。した
50

がって、頭部外傷を患う患者にヒトsHASEGPを投与することで、組織ヒアルロنانの蓄積およびそれと関係する水を除去することができる。ヒトsHASEGPをシャントにより髄腔内に投与することができ、あるいは、過シアル化sHASEGPを静脈内投与して脳組織に到達させることができる。

【0465】

脳卒中で起るような脳の虚血後、ヒアルロنانの含量は、HAシターゼの発現の増加および異化の減少によって劇的に増加する。イオンポンプの不全および間質中への血漿の漏出は体液貯留(状態)を引き起こし、それがリンパ管により適切に除去されない場合には組織の壊死を引き起こす。いくつかのグループは血管透過性を遮断することによって、虚血再灌流後の間質液の蓄積を阻止しようと試みてきた。しかしながら、間質液が溢出してしまったら、血管透過性を阻止することは、浮腫の分解を妨害し病状を悪化させてしまう可能性がある。

10

【0466】

ヒトsHASEGPを脳腫瘍と関連する浮腫、特に多形性膠芽腫と関連する浮腫の治療で使用することもできる。脳腫瘍と関連する浮腫は、腫瘍に隣接するがんではない脳の部分におけるヒアルロنانの蓄積から生ずる。ヒアルロنانの蓄積部位にヒアルロニダーゼを投与することで(例えば、静脈注射によりまたはシャントを介して)、そのような悪性腫瘍と関連する浮腫を、これらの部位の過剰なヒアルロナンを分解することによって取り除くことができる。このように、ヒアルロニダーゼは腫瘍の収縮ならびに腫瘍の増殖および/または転移の障害で脳腫瘍の治療に功を奏するだけでなく、これは悪性腫瘍と関連する浮腫を取り除くにも有用である。ヒトsHASEGPを浮腫の治療のためにウシ睾丸ヒアルロニダーゼの投与に対するのと同様の方法で投与して、浮腫を治療することができる(例えば、Sa Earp Arq. Braz. Med. 44:217-20を参照されたい)。

20

【0467】

心血管疾患におけるグリコサミノグリカンの蓄積の治療

実験的心筋梗塞に従う動物モデルにヒアルロニダーゼを投与することで、梗塞面積を縮小することができるということが明らかとされている(Maclean, et. al Science 1976 Oct 8;194(4261):199-200)。ウシヒアルロニダーゼが動物で梗塞面積を縮小すると提唱されている機構は、虚血再灌流後に起るヒアルロنانの蓄積を低下させることによるものである。梗塞面積の縮小は、リンパ液排水の増加および組織酸素化の増加ならびに心筋の水分含量の減少から生じるものと考えられている。梗塞面積の縮小は動物モデルでは得られたが、その利益は、ヒトでの大規模な臨床研究では実現されなかった。ウシ睾丸ヒアルロニダーゼは、動物およびヒトで約3分と非常に短い血清中半減期を有する(Wolf, et. al., J Pharmacol Exp Ther 1982 Aug;222(2):331-7)。この短い半減期は、細網内皮系のスカベンジャー受容体により容易に認識される末端マンノース残基によるものである。小動物は血管床が小さいためにヒアルロニダーゼからの恩恵を享受することができるが、半減期が増加した酵素が必要とされる。過シアル化sHASEGPは、スカベンジャー受容体が存在しないシアル化により、さらに好ましい薬物動態を有する。100~200,000単位/kgに及ぶ用量の過シアル化sHASEGPを利用して、虚血再灌流後の過剰なヒアルロنانの分解を促進させることや梗塞面積を縮小させることができる。

30

40

【0468】

過シアル化sHASEGPを利用して、動脈硬化症による冠動脈粥腫を抑えることもできる。そのような粥腫はグリコサミノグリカンを蓄積し、それはマクロファージおよび泡沫細胞の接着を媒介する(Kolodgie et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Oct 1;22(10):1642-8)。過シアル化sHASEGPの投与を利用して、粥腫の形成を低下させることができる。ヒアルロニダーゼの反復投与を100~100,000U/kgの用量で企図する場合、免疫原性の危険が低く半減期が増加したヒト組換えタンパク質を利用する必要性によって、粥腫の優位な低下が得られることになる。

【0469】

末梢組織の壊死の治療

50

組織の壊死は、多くの疾患で静脈不全によって起る。十分な酸化の欠如は、組織の再生に対する大きな障害の一つとなっている。ヒアルロニダーゼによる動脈内処置によって、末梢動脈閉塞疾患の患者において臨床像が顕著に改善されることが実証されている(Elder et. al, Lancet (1980) 648-649)。sHASEGPを1週間に3～5回、10～200,000単位の用量で動脈内に注射することができる。

【0470】

麻酔の増強

食肉処理場に由来するヒアルロニダーゼは、眼科手術の前に、局所麻酔で眼球周囲ブロックによく用いられる。この酵素が存在することで、さらにブロックをする必要がなくなり、無運動(眼球運動の喪失)の開始までの時間が速まる。眼球周囲およびテノン嚢下ブロックは、眼科手術用のヒアルロニダーゼで最も多く見られる用途である。Wydase(登録商標)の中止以来、複視および下垂症が増加するという報告がこれまでに眼球周囲ブロックで報告されている(Brown et al J Cataract Refract Surg 1999; 25:1245-9)。

【0471】

Wyeth社のWydase(登録商標)の中止により、ウシ精巢に由来するヒアルロニダーゼ原料がcompounding pharmaciesから現在供給されている。しかしながら、即席で調合される無菌製剤を使用することにはいくつかの懸念事項がある。http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=942_6953-ref#ref。調合製剤はFDAに認可された製品ではない。したがって、FDAは製造工程の特質または一貫性についてどうすることもできない。

【0472】

10～500単位のsHASEGPを2%リドカイン(キシロカイン) 5ml、0.5%ピピバカイン(マーカイン) 5mlとおよび任意でエピネフリンと1:200,000で直接混合することができる。sHASEGPを使用して無運動の開始を増進させたりさらにブロックをする必要性をなくしたりすることができる。sHASEGPは眼瞼形成および美容形成の整容手術に対する無運動に理想的でもある。そのような外科手術後にsHASEGPを利用して、抗炎症物質を拡散させたり組織膨張を低下させたりすることもできる。

【0473】

sHASEGPを重碳酸緩衝液などの緩衝液と混合して、注射手順の間の不快感を防ぐこともできる。sHASEGPを同様に裂傷用の麻酔と混合して、注射に必要な物質の総量を減らすことも組織の膨張からくる苦痛を軽減させることもできる。

【0474】

眼内圧の低下

手術後の白内障患者に起る一般的な副作用は、かなり早期の、場合によっては長期の眼内圧の上昇である。そのような症状は、特に緑内障性視神経乳頭の変化がある患者では、重症となることもある。その圧力の増加はヒアルロン酸などの粘弾性物質を手術の間に眼に注射する場合にいっそう激しくなる傾向があるが、そのような物質を利用しない場合でさえも、この眼内圧は術後に上昇することになる可能性がある。さらに、そのような圧力の増加は、さらなる薬剤を外科手術の間に使用しない場合でさえも起る可能性がある。場合によっては、眼内に粘弾性物質を残すことが有利であり、これには患者に大量の炭酸脱水酵素阻害薬を投与することが必要になることもある。これらの阻害薬は、房水、つまり毛様体により眼内に通常分泌される体液の形成を減少させることによって眼内圧を低下させる。術後の眼内圧の増加を軽減するための現在の方法としては、 α -アドレナリン遮断薬、交感神経様作用薬、縮瞳薬、II選択薬、炭酸脱水酵素阻害薬およびプロスタグランジン薬などの各種の点眼薬が挙げられる。

【0475】

ヒアルロン酸のような粘弾性物質を除去する好ましい方法は、(眼球)前部または後部外科手術の間にまたは直後にsHASEGPを注射することによるものであるが、当技術分野において知られる他の投与方法も同様に可能である。眼球前部の外科手術の間にヒアルロン酸およびsHASEGPを前眼房内に注射することにより投与して、その外科手術の開始の間にヒ

10

20

30

40

50

アルロン酸をスペーサーとして作用させることができれば好ましい。角膜移植の一部の症例では、角膜移植体を適所に縫合する前に、ヒアルロン酸およびsHASEGPの複合物を眼内構造物の表面に配置することができる。この複合物を網膜または硝子体手術などの(眼球)後部手術に使用することもできる。

【0476】

場合によっては、Healon(商標)、Viscoat(商標)、またはその他の空間占有物質(space-occupying substance)などの粘弾性物質を手術の終わりに眼の前眼房内に残しておくことが望ましいこともある。これは、眼球内の内容物が角膜後面の前方に押し出てそれを圧迫する傾向がある陽圧上昇で特にあてはまる。これが眼内合成レンズを適所に装着している眼で発生すると、角膜内皮細胞への圧力がこの細胞に著しい損傷を引き起し、続いて角膜の腫張および混濁化を引き起こす可能性があり、これが視力の低下に結び付くことになる。通常、患者の眼内圧が手術法の終わりに著しく上昇する場合、このような患者に大量の炭酸脱水酵素阻害薬、ならびに房水産生を低下させるおよび/または房水流出を増加させる遮断薬およびIIアゴニストなどの局所外用点眼薬を投与する必要がある。これらの作用物質には全て顕著な副作用があり、場合によっては、それらは呼吸器障害、心臓疾患または高血圧などの各種の病状がある患者には禁忌である。しかしながら、これらの状況でsHASEGPを使用することにより、これらの患者にそのような薬物を大量に投与する必要性がなくなるであろう。

10

【0477】

さらに、小柱網の中には相当量のヒアルロン酸が存在している。sHASEGPはこれを壊し、小柱網からの房水の流出を改善する。そして、患者の眼内圧は低下する。sHASEGPを白内障の手術でスペーサーおよび/または保護剤として使用される、メチルセルロース(Ocucostat.RTM. 例えば、Storz Instrument社から市販されている)などの他の前眼房用の薬剤と併用するのも、これにより実質的に小柱網が開かれ、小柱網に存在している相当量のヒアルロン酸が取り除かれることによって、いっそうの房水流出が可能になるので、顕著な圧力上昇を予防するうえで有効になる。

20

【0478】

グリコサミノグリカンを小柱網から除去することも、開放角緑内障を患う個体で眼内圧を低下させるのに有用である。ヒトsHASEGPを結膜下注射によりまたは前眼房に直接注射することにより投与することができる。

30

【0479】

ガングリオン嚢胞

ガングリオン嚢胞(手関節の嚢胞、Bible嚢胞、または背側腱の嚢胞としても知られる)は、最もよく見られる手の軟組織腫瘍である。それは体液によって満たされた嚢であり、これは皮膚の下に感じられる。これは通常、手もしくは手首の腱鞘(腱を滑らかにする内層)に付着しているかまたは下層の関節と付着している;しかしながら、どの構造体にも明白には付着していないものもある。これらは足にも発生する。腱または関節の内層を覆う靭帯に断裂があり、その内層が靭帯欠損部から脱漏し、それによって皮膚の下に瘤を引き起こす時に、これは発生することが多い。付随して炎症が起ることが多いため、その炎症性組織がゼリー状の体液を産生し、これがその突起嚢を満たす。それらは嚢胞内に含まれる粘液様の体液が高圧であるために岩のように硬いこともあり、これらは骨ばっている隆起と間違えられることが多い。

40

【0480】

sHASEGPを利用してガングリオン嚢胞を改善することができる。微細針吸引に先行して5~1000単位のsHASEGPを病巣内注射することで、外科手術を必要とせずに嚢胞が除去される。コルチコステロイドを任意でsHASEGPと同様に注射することができる。患者のなかには、さらなる注射が必要になることもある。

【0481】

粘液水腫

皮膚のグリコサミノグリカン(GAG)浸潤は、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、前

50

脛骨粘液水腫、硬化性粘液水腫、および浮腫性硬化症の特徴である。ヒアルロン酸はその病状の全てでおよび正常皮膚で主要なGAGである。GAGの皮膚分布に関する組織学的なばらつきがわずかに存在する。後天性の皮膚ムチン沈着症は、類似の皮膚GAG分布および生化学的組成を示す。形態学による線維芽細胞活性の相違から、浮腫性硬化症および硬化性粘液水腫のムチン沈着が局所的過程に相当するものであるのに対し、甲状腺疾患のGAG浸潤は全身由来である可能性があることが示唆される。これらの疾患は局所および全身両方の投与経路由来のsHASEGPで改善させることができる。長期治療の場合、ペグ化sHASEGPを想定することができる。

【0482】

肺でのsHASEGPの使用

健康人由来の気管支肺胞洗浄液(BAL)中のヒアルロنانの量は一般に15ng/ml未満である。しかしながら、BAL中の量は、呼吸困難の症状で劇的に上昇する(Bjermer Br Med J (Clin Res Ed) 1987 Oct 3;295(6602):803-6)。例えば、ARDSでは、ヒアルロنانの量は500ng/mlまで増加する可能性があり、いっぽう農夫肺では、BAL中の量は1000ng/mlを上回る可能性がある(Hallgren et al Am Rev Respir Dis. 1989 Mar;139(3):682-7)、(Larsson et al Chest. 1992 Jan;101(1):109-14)。肺中のヒアルロنانの増加は、酸素の拡散およびガス交換を阻止するばかりか好中球およびマクロファージ反応の活性化も阻止する可能性がある。

【0483】

ウシのヒアルロニダーゼ製剤は、いくつかの理由からそのような症状の治療には好ましくない。第一に、食肉処理場からの精巢に由来するヒアルロニダーゼ製剤には、アクロシンなどのセリンプロテアーゼが混入していることが知られている。第二に、ウシ酵素の異質的性質がアナフィラキシー反応の確率を増大させ、これが患者の死につながる可能性がある。したがって、組換えヒトsHASEGPの高純度製剤を経肺または経静脈送達により送達することができる。ヒトsHASEGPをグリコサミノグリカンの上昇と関係がある他の肺合併症を患う患者に投与することもでき、またはそれを肺に同時送達される他の分子の送達を促進させるために投与することもできる。

【0484】

本発明をこれから、限定ではない以下の例を参照することによりさらに詳細に記述することとする。

【0485】

実施例1

マイクロタイターに基づくヒアルロニダーゼアッセイ

以下の例は、sHASEGPのヒアルロニダーゼ活性を測定するための迅速なアッセイを提供するものである。ヒアルロニダーゼのW.H.O.標準品を使用することにより、このアッセイをTRU、IUまたはNFUに関連させることができる。

【0486】

ビオチン化ヒアルロナン・マイクロタイターアッセイ

ヒアルロナンはグルクロン酸残基の遊離カルボキシル基をビオチン-ヒドラジド(Pierce)、スルホNHS(Pierce)および1-エチルジメチルアミノプロピル-カルボジイミド(Sigma)による1段階反応でビオチン化する。このビオチン化されたHA基質を第2反応で96ウェルマイクロタイタープレートに共有結合させる。酵素反応の完了時に、残る基質を標準的なELISAプレートリーダーで測定できるアビジン-ペルオキシダーゼ反応により検出する。基質はマイクロタイタープレートに共有結合されるので、ビオチン化基質のpH依存的な置換などの人為的結果は起こらない。その感度により、アッセイ間のばらつき10%未満で培養細胞および生体試料のヒアルロニダーゼ活性を迅速に測定できる。

【0487】

a. 手順

ビオチン化HA基質の調製

HA (Sigma Chemicals) 100mgを0.1M MES、pH5.0に溶解して終濃度1mg/mlとし、これを

10

20

30

40

50

ビオチンのカップリング前に4 で少なくとも24時間溶解させた。このCS04 MES溶液にスルホ-NHS(Pierce; Rockford IL)を添加して終濃度0.184mg/mlとした。ビオチンヒドラジド(Pierce)を100mMのストック溶液としてDMSOに溶解し、これを前記CS04溶液に添加して終濃度1mMとした。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)のストック溶液を蒸留水に100mMストック溶液として調製し、これを終濃度30mMで前記HAビオチン溶液に添加した。この溶液を4 で一晩攪拌させた。未結合のビオチンおよびEDACを水に対する透析により、1000倍容量の水を3回交換することで除去した。この透析したビオチン化HA(bHA)を分注し、これを数ヶ月まで-20 で保存した。

【 0 4 8 8 】

スルホ-NHSを濃度0.2mg/mlのbHAの入った水に希釈して0.184mg/mlとし、これを96ウェルCOVALINK-NHプレート(NUNC; Placerville NJ)中に1ウェルあたり50 μ lとしてピペットで移した。EDACを水に希釈して0.123mg/mlとし、これをbHA溶液の入ったCOVALINK-NHプレート中にピペットで移し、10 μ g/ウェルbHAおよび6.15 μ g/ウェルEDACの終濃度を得た。このプレートを4 で一晩または23 で2時間インキュベートし、これにより同様の結果を得た。マイクロタイタープレートにbCS04を共有結合固定化後、カップリング溶液を振盪により除去し、2M NaClおよび50mM MgSO₄を含有するPBS(緩衝液A)でこのプレートを3回洗浄した。このプレートは1週間まで4 で保存することができた。

【 0 4 8 9 】

bHAを固定化したCOVALINK-NHプレートを1ウェルあたり100 μ lのアッセイ用緩衝液-リソソームヒアルロニダーゼ用の0.1Mギ酸塩、pH3.7、0.1M NaCl、1% TRITON X-100界面活性剤、5mMサッカロラクトン; または中性活性酵素用の1mM CaCl₂および1mg/mlヒト血清アルブミン(ICN)が入った10mM Hepes pH7.4で平衡化した。ウシ睾丸ヒアルロニダーゼ(SigmaタイプVI-S)を中性の酵素用緩衝液に1.0 ~ 1x10⁻⁶ rTRU/ウェルまで希釈し100 μ l/ウェルを3重でアッセイすることによって、酵素活性を「相対的濁度減少単位」(rTRU)に対して校正するための一組の標準物質を作製した。酸性活性ヒアルロニダーゼの試料をリソソームアッセイ用緩衝液に10倍 ~ 130,000倍まで希釈し、これらを3重で100 μ l/ウェルとしてピペットで移した。組織抽出物およびヒト血漿の大部分のアッセイの場合、37 で30分のインキュベーションで十分であった。陽性および陰性対照のウェル(それぞれ、酵素なしまたはABCなし(以下を参照されたい))を3重で含めた。

【 0 4 9 0 】

1ウェルあたり6MグアニジンHClを200 μ l添加することによって反応を停止し、続けて1ウェルあたりPBS、2M NaCl、50mM MgSO₄、0.05% TWEEN 20界面活性剤(緩衝液B) 300 μ lで3回洗浄した。アビジン・ビオチン複合体(ABC)キット(Vector Labs; Burlingame CA)は、先のインキュベーションの間に室温で30分間プレインキュベートさせておいた0.1% TWEEN 20界面活性剤を含有するPBS 10ml中に調製した。このABC溶液を添加し(100 μ l/ウェル)、室温で30分間インキュベートした。このプレートを緩衝液Bで5回洗浄し、次いで10mg o-フェニレンジアミン(OPD) 1錠を0.1Mクエン酸-PO₄緩衝液(pH5.3)10mlに溶解し、これに30% H₂O₂ 7.5 μ lを添加することによって、OPD基質を1ウェルあたり100 μ lで添加した。このプレートを暗所中で10 ~ 15分間インキュベートし、次いでこれをBiometallics (Princeton NJ)のDelta Soft IIプレートリーダー用ソフトウェアを使いコンピュータにより監視されるELISAプレートリーダー(Titertek Multiskan PLUS; ICN)中で492nmのフィルターを用いて測定した。ウシ睾丸ヒアルロニダーゼによる標準曲線を市販のヒアルロニダーゼ製剤の4パラメータ曲線適合により作成し、未知試料を492nmでのその吸収により内挿した。

【 0 4 9 1 】

ヒアルロニダーゼのpH依存性を分析するために、精製した組換えsHASEGPおよびウシ睾丸ヒアルロニダーゼを使用する。酵素活性のpH依存性は、精製したsHASEGPまたは部分精製したウシ睾丸ヒアルロニダーゼを0.1 rTRUまで以下の緩衝液: 50mMギ酸緩衝液、pH3 ~ 4.5; 50mM酢酸緩衝液、pH5 ~ 6; 50mM MES緩衝液、pH6 ~ 7; または50mM HEPES緩衝液、pH7 ~ 8に希釈することにより測定する。各試料を37 で30分間アッセイし、活性を最大活性に対する百分率として表した。NaClは、これが睾丸ヒアルロニダーゼ製剤の最適pHを変化

10

20

30

40

50

させてしまう可能性があるため、緩衝液に入れなかった(Gold, Biochem. J. 205:69-74, 1982; Gacesa et al. Biochem. Soc. Trans. 7:1287-1289, 1979); 生理的な食塩濃度(0.15M)は見かけ上の最適pHをある効力で低下させた。その効力は最初の未精製試料においてよりも精製した睾丸酵素の製剤において顕著であった。

【0492】

b. 結果

ヒアルロナンをビオチン-ヒドラジドおよびEDACによる1段階反応でビオチン化した。HAの遊離カルボキシル基をビオチン-ヒドラジドと結合させるEDACを制限することによって、HAの全グルクロン酸残基のごくわずかな部分だけを標識した。HA ($2.8 \times 10^{-3}M$)に添加したこのEDAC ($3 \times 10^{-5}M$)量により、HAの93ジサッカライド単位につき結合しているビオチン-ヒドラジドの分子が最大で1個となる。

【0493】

pH3.7で測定し、1.0から 1×10^{-6} TRU/ウェルに希釈したウシ睾丸ヒアルロニダーゼ標準反応液の4パラメータ曲線適合を作成した。4パラメータ曲線適合は、式 $y = ((A-D)/(1 + (conc/C)^B)) + D$ 、式中 $\log_{10} y = \ln(y'/1-y')$ 、 $y' = (y-D)/(A-D)$ 、 $B = -b/\ln 10$ および $C = EXP(a/B)$ から確立した。この4パラメータ(A、B、C、D)を、直線回帰の2+2アルゴリズムを利用したソフトウェアプログラムで計算した(Rodbard et al., Clin. Chem. 22:350, 1976)。この曲線適合はシグモイド面を標準曲線に組み入れるものである。試料を測定するために最適な精度は通常、30分のインキュベーションに対し0.001から0.01 TRU/ウェルで得られる。60分のインキュベーションの間には、1000分の1のTRUを検出可能である。数値データのごく狭い範囲に対し標準的な対数曲線を利用して、標準曲線適合を確立することもできる。本発明を具体的な好ましい実施形態に関連して記述してきたが、当然のことながら特許請求の範囲に記載の本発明は、そのような具体的な実施形態に不当に限定されるべきではないと理解されるべきである。

【0494】

実施例2

sHASEGP cDNAのクローニング

ヒトsHASEGPをコードする核酸は当業者によって、人工遺伝子合成、RT-PCR、およびcDNAライブラリーハイブリダイゼーションを含むがこれらに限定されない、いくつかの手順により合成されることができる(例えば、Gmachl et al FEBS 336(3) 1993, Kimmel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1993 10071-10075を参照されたい)。あるいは、ヒトsHASEGPをコードするクローンをIMAGE、またはヒト遺伝子配列のその他の供給業者(InvitrogenクローンID IOH10647)から得ることができる。

【0495】

完全長のヒトPH20 cDNAは長さが2009ヌクレオチドになると算出され、これは1530ヌクレオチドの読み取り枠を含んでいた。この5'UTRは異常に大きく、このことはイントロンの残存を示唆している可能性があり、このことは5'UTRにある9個の非翻訳開始コドンによってリボソームが正しいメチオニン開始コドンに結合するのを妨害することで翻訳を阻害している可能性がある。そのタンパク質(Genbank Accession number NP_003108)は、計算による分子量が58kDaの509アミノ酸(SEQ ID NO.1)を含むものと予想される。

【0496】

各クローンを配列決定するために、PCR増幅したバンドを切り出し、これをGel Extractionキット(Qiagen)で溶出し、制限消化によって適合性末端を有する適当なベクターにこれをクローニングした。配列決定反応は全て二本鎖DNAに対し、Taqダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット(Applied Biosystems)を製造元の使用説明書にしたがって用いて行い、その反応物をABI Prism(商標)自動シーケンサー(Applied Biosystems)で泳動した。

【0497】

ヒトPH-20の読み取り枠は、プライマーとしてSEQ ID NO 14およびSEQ ID NO 47を用いたポリメラーゼ連鎖反応によりヒト精巣cDNAライブラリー(Clontech, Palo Alto CA)を増

10

20

30

40

50

幅することで得た。PCR産物をNheIおよびBamHIで消化し、これをベクター IRESpuro2 (Clontech)のNheIおよびBamHI部位にクローニングした。

【0498】

実施例-4

ヒトPH20 cDNAからのsHASEGPの単離

哺乳類細胞で効果的なグリコシル化を可能とする、触媒的に活性な分泌型の組換えヒトsHASEGP発現ベクターを下記のように作製した。sHASEGPを産生することもできる酵母および昆虫細胞などの異なる種に対するプロモーターおよび選択遺伝子を有するその他の発現構築体が企図される。グルタミンシンターゼまたはジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)などの陽性選択遺伝子を使用することもできる。下記の例は、限定することを意図するものではなく、むしろ使用できるいくつかのプラスミド発現系の一例として提供されるものである。

【0499】

分泌型のsHASEGPを構築するために、疎水性のC末端がない切断型変異体を構築した。GPI切断部位予測プログラムを使用したところ、GPIアンカー切断部位がその完全長のGPI-アンカー型タンパク質のアミノ酸位置N483の周囲に位置していた。7組のネスト型3'プライマーを使用して、位置Y482から始まり前進的に1アミノ酸ずつアミノ酸を欠失した、予測のGPIアンカーがない7組の切断型欠失変異体を構築した。これらのプライマーは適合性のNheI (5'側)およびBamHI (3'側)部位を有するように設計して、その切断型変異体をベクター Irespuro2に、3'プライマー中の停止コドンによりタグなしでまたは精製および検出を容易とするためにC末端Hisタグタンパク質としてクローニングした。例えば、リバースプライマーのSEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、およびSEQ ID NO.10を使用して位置Y482、F481およびI480で終わり6個のHisタグがない欠失変異体を作製した。その他の変異プライマーは、特定のアミノ酸を含むおよび除くように適当な修飾を加えて同じ塩基設計で作製した。Hisタグ変異体を作製するため、タグがない変異体に対するのと同じセットのプライマーを使用するが、但し、各プライマーはそれぞれのリバースプライマーには停止コドンがなく、フォワードプライマーは同じままである(Hisタグ構築の場合には、SEQ ID NO.19、20、21、22、23、24および25を有するプライマーを参照されたい。それらはタグがないリバースプライマーに対応する、停止コドンなしのその各構築体用のリバースプライマーである)。重複プライマーを使用してIrespuro2ベクター中のBamHIおよびNotI部位の内側にヘキサヒスチジンによる6アミノ酸のスペーサーを構築し、したがってHisタグ変異体はPCR増幅し制限消化した産物をそのhisタグ含有Irespuro2ベクター中のNheIおよびBamHI部位の内側に連結することによって作製された。

【0500】

ヒトsHASEGPをそのカルボキシ末端で修飾して分泌型酵素および中性活性酵素を産生させることができるかどうかを確認するため、一連の切断型をGPIアンカー付着部位からハチ毒酵素との相同性に基づいて予測される「触媒ドメイン」までで作製した。

【0501】

ヒトsHASEGPの完全長GPIアンカー型クローンをIRESPuro2中でコードするDNAを鋳型として使用して、さまざまな切断型の欠失変異体を作製した。ソフトウェアのモデル化プログラムにより、その完全長のポリペプチドに対して予測されるいくつかの切断部位が得られた。そのように予測された部位のうちの1つがアミノ酸位置N483 (SEQ ID NO.1)であった。PCRプライマーはタンパク質をN483から連続的に切断するように設計して、Y482 (Nを欠く)で始まりE477 (Pを欠く)で終わる6種の欠失変異体を作製した。

【0502】

a. 手順

N483を欠く切断型変異体の作製:

pIRESpuro2中のNheIとBanHI部位との間の完全長のGPIアンカー型sHASEGPクローンを鋳型として使用した。この鋳型は、NheI部位を含み天然シグナルペプチドの開始メチオニンで、つまりM1で始まる5'プライマー (SEQ ID NO.14)、およびBamHI部位を含みY482で終わる3'プライマー (SEQ ID NO.8)で増幅した。このPCR産物を1%アガロースゲルで泳動して分

離し正しい大きさの増幅バンドを確認し、これをゲル精製し、NheIおよびBamHIで制限消化し、ベクター-pIRES-puro2 (Clontech)中にNheIとBamHI部位との間でクローニングし、それによってアミノ酸位置N482で終わりGPIアンカーがなく、示したようなアミノ酸配列(結果的に得られるY482までのsHASEGPポリペプチドの配列の場合にはSEQ ID NO.5)およびヌクレオチド配列(SEQ ID NO.48 - SEQ ID NO.5のポリペプチドをコードするヌクレオチド)を有するこのsHASEGPの切断型変異体を発現させるための発現ベクターを作製した。

【 0 5 0 3 】

それぞれY482、F481、I480、Q479、およびP478を欠く、その他の切断型変異体の作製。

【 0 5 0 4 】

唯一の相違は各変異体に対する適当な3'プライマーを用いるというだけで、同じ戦略を使った。それぞれの3'プライマーは次の通りである。

Y482を欠くsHASEGP変異体に対する3'プライマー -SEQ ID NO.9

F481を欠く変異体に対する3'プライマー -SEQ ID NO.10

I480を欠く変異体に対する3'プライマー -SEQ ID NO.11

Q479を欠く変異体に対する3'プライマー -SEQ ID NO.12

P478を欠く変異体に対する3'プライマー -SEQ ID NO.13

【 0 5 0 5 】

sHASEGPの最小活性ドメインを決定するためのさらなる欠失変異体の作製

さらなる欠失は10~20アミノ酸のブロックで、sHASEGPの中性pHで活性な最内部の切断型変異体(これはE477までのsHASEGPである)の3'末端から作製した。NheIフォワードプライマー(SEQ ID NO.14)を適切に位置させた3'プライマーとともに使用して、カルボキシ末端から所望の長さのsHASEGPの欠失変異体をPCR増幅させた。例えば、SEQ ID NO.14およびSEQ ID NO.26に記載のプライマーをそれぞれ5'および3'プライマーとして用いるPCRを利用して、(そのPCR産物を)IresPuro2ベクターの発現用構築体から発現させることでSEQ ID NO.49のポリペプチドを産生させた。同様に、SEQ ID NO 27、28、29、30、31および32に記載の3'リバースプライマーを用いるPCRを利用して、成熟sHASEGPのそれぞれA447、S430、G413、S394、A372、およびS347のアミノ酸位置で終わる欠失変異体を産生させた。いずれの場合にもPCR産物をNheIおよびBamHI酵素で消化し、その消化産物をpIresPuro2ベクター中にNheIとBamHI部位との間でクローニングした。各群から最終的な発現構築体の独立クローンのいくつかをCD-CHO無血清培地(Invitrogen, CA)中のCHO細胞に一過性にトランスフェクションし、アッセイのために指定の時点で試料を得ることによって、分泌型の中性活性sHASEGPの活性について試験した。終夜培養物から調製した少量調製DNAを製造元推奨の手順にしたがってGenejuice (Novagen, CA)トランスフェクション試薬を用いてトランスフェクトした。ヒアルロニダーゼ活性を前述のマイクロタイターアッセイにより測定した。

【 0 5 0 6 】

b. 結果

【 0 5 0 7 】

ヒアルロニダーゼ活性をsHASEGP切断型変異体で測定して、分泌型の中性活性ヒアルロニダーゼ活性に対する最小の活性ドメインを同定した。

10

20

30

40

アミノ酸 1 ~	U/ML/24 時間 PH7.4
347	0.000
372	0.000
394	0.000
413	0.000
430	0.000
447	0.000
467	0.089
477	0.567
478	0.692
479	0.750
480	0.575
481	0.740
482	0.329
483	0.800
509	0.044

10

20

【0508】

この結果により、Y482からE477までの指定のアミノ酸で終わる6種の1アミノ酸欠失変異体の全てがGPIアンカー型sHASEGPよりも高い分泌活性を示すことが明らかとなった。

【0509】

この結果から同様に、A467を超える欠失はすべての分泌活性をなくすことが明らかとなった。各A467クローンの分泌型の中性活性は、P478またはN483の各クローンで認められたものの約10%に減少していた。したがって、ハチ毒酵素から前もって想定されたものよりもヒトsHASEGPのカルボキシ末端ドメインの多くが中性活性ヒアルロニダーゼドメインを作り出すのに必要になると結論付けられた。カルボキシ末端ドメインの各システインはしたがって、中性活性に必要である。N483のGPI切断部位前の約10アミノ酸に及ぶ非常に狭い範囲がしたがって、最小の活性ドメインと定義された。

30

【0510】

実施例5-sHASEGP分泌活性に対するシグナルペプチド修飾の効果

ヒトsHASEGPは異常に長いと予想される天然リーダーペプチドを有する。さらに、リーダーペプチド中の2つの隣接システイン残基の存在によって、多量発現時には小胞体内でポリペプチド多量体の凝集が起り、したがってsHASEGPの多量発現が抑制されている可能性がある。したがって、いっそう効果的な一連の分泌リーダーペプチドを試験して、sHASEGPの分泌に向けた標的化を促進させるその能力について調べた。

40

【0511】

a. 手順

リーダーペプチドをSEQ ID NO 37、38、39および40内の配列に対応するプライマーによる重複プライマーのアニーリングおよびPCR伸長によって構築した。得られたPCR増幅配列を5'末端にNheI部位を含む隣接プライマー(SEQ ID NO.41に記載の通り)および3'末端にEcoRI部位を含む隣接プライマー(SEQ ID NO.42に記載の通り)で増幅させた。これにより、リーダーペプチド(このポリペプチド配列はSEQ ID NO.43に記載されている通りで

50

ある)をLitmus 39 (NEB)ベクター中にNheIとEcoRI部位との間でクローニングすることができた。sHASEGPには内部にEcoRI部位がある; したがってNheI部位とEcoRI部位との間のこの構築体を5' SpeIプライマー (SEQ ID NO.44に記載の通り)および3' MluIプライマー (SEQ ID NO.45に記載の通り)でさらに増幅させた。P478で終わりGPIアンカーがないsHASEGPをpIresPuro2からNheIおよびBamHIで切り出し、これをLitmus 39 (NEB)ベクター中にLitmus 39ベクターのNheIおよびBamHI部位内でクローニングした。得られたこのsHASEGPを含むLitmusベクターを制限酵素SpeIおよびMluIで消化し、SpeIおよびMluIプライマーで増幅させたリーダー構築体をその中にクローニングした。部位特異的突然変異誘発法を配列とsHASEGP配列の両方を含むこのLitmus 39ベクターに行って、sHASEGPの成熟ポリペプチドとのリーダー配列の読み枠を合わせた融合体を作製した。SEQ ID NO.34および35に対応するプライマー対を使用して、sHASEGP(P478まで)のF38に融合した天然Aspを末端アミノ酸として有するリーダーを作製した(この融合タンパク質のポリペプチド配列についてはSEQ ID NO.46に記載されている通り)。その他のプライマー対の組合せは、例えば具体的には、SEQ ID NO.33をSEQ ID NO.35とともに使用してsHASEGPのL36に融合した末端Asp(D)で終わるリーダーを作製し、SEQ ID NO.33をSEQ ID NO.36とともに使用してsHASEGPのL36に融合したGly(G)(末端Asp(D)の前)で終わるリーダーを作製し、およびSEQ ID NO.34をSEQ ID NO.36とともに使用してsHASEGPのF38に融合したGly(G)(末端Asp(D)の前)で終わるリーダーを作製した。部位特異的突然変異誘発法により得られた-sHASEGP融合体をゲル精製し、これを酵素DpnIで消化して持ち越しによるすべての親DNAを消化し、その後、これをNheIおよびBamHIで消化し、Hisタグ(6個のヒスチジンによる6アミノ酸のスペーサー)がpIresPuro2中のBamHIとNotI部位との間にクローニングされている、NheI/BamHI消化HisIresPuro2骨格中にそれをクローニングした。したがって、ライゲーションにより、本発明者らはNheI-sHASEGP-BamHI-HisのpIresPuro2構築体を得た。そのような構築体を4セット得た。それらはリーダー末端がGまたはDおよび成熟sHASEGPの始まりがL36またはF38の組合せに相当するはずである。各種の構築体由来の独立クローンのいくつかをCD-CHO培地 (Invitrogen, CA)中のCHO細胞にトランスフェクトし、分泌リーダーの存在が天然分泌リーダーと比べて分泌タンパク質量の増加を促進できるかどうかについて試験した。終夜培養物から調製した少量調製DNAを製造元推奨の手順にしたがってGene Juice (Novagen, CA)トランスフェクション試薬を用いてトランスフェクトし、マイクロタイターアッセイにより試験するために指定の時点で試料を得た。ヒアルロニダーゼ活性を前述のマイクロタイターアッセイにより測定した。

【0512】

マウスIgG鎖リーダーペプチドsHASEGP融合構築体を試験して、分泌型の中性活性sHASEGPの活性がいっそう高いレベルであるかについて調べた。

【0513】

b. 結果

ヒトsHASEGP 遺伝子構築体	U/ML/24時間 PH 7.4
IgG _K リーダーsHASEGPアミノ酸 38~478 HIS6	3.0257
天然リーダーsHASEGP アミノ酸 1~478 HIS6	0.4857

【0514】

酵素アッセイの結果から、IgGリーダーはそのようなリーダーを欠いたクローンP478、Y482またはN483と比較した場合、sHASEGPの分泌を天然分泌リーダーよりも約7~8倍高く促進できることが示唆された。リーダーのAspまたはGlyからsHASEGPのL36またはF38までのリーダー融合部位が違ったその他のリーダー構築体は、分泌型の中性活性ヒアルロニダーゼ活性レベルの増加を同様にもたらした。その他の効果的な分泌リーダー配列を同じ技術で利用することができるので、これらの例は、本発明の範囲を限定するものではなく広げるものであることが意図される。

【 0 5 1 5 】

実施例6

ヒトsHASEGP発現ベクターの作製

エピトープタグがないsHASEGPを2シストロン性の発現用カセットHZ24 (SEQ ID NO 47) へのクローニングにより作製した。sHASEGPを発現させるためのHZ24プラスミドベクターは、pCIベクター骨格(Promega)、ヒトPH20ヒアルロニダーゼのアミノ酸1~482をコードするDNA配列、ECMVウイルス由来の内部リボソーム侵入配列(IRES)(Clontech)、およびマウスジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子を含む。このpCIベクター骨格は同様に、 β -ラクタマーゼ耐性遺伝子(AmpR)、f1複製起点、サイトメガロウイルス前初期エンハンサー/プロモーター領域(CMV)、キメライントロン、およびSV40後期ポリアデニル化シグナル(SV40)をコードするDNAを含む。sHASEGP構築体をコードするDNAは、天然シグナルリーダーのメチオニンにコザック共通配列を含んでおり、482番目のチロシンに停止コドンを含んでいた。結果として得られた構築体pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24)はCMVプロモーターにより推進される単一mRNA種であって、内部リボソーム侵入配列により分離されたPH20のアミノ酸1~482とジヒドロ葉酸還元酵素のアミノ酸1~187とをコードするその種をもたらす。

10

【 0 5 1 6 】

ヒトPH20の読み取り枠をInvitrogen ORFクローン(10H10647, Invitrogen, Carlsbad CA)から、NheI部位とPH20のメチオニンの前にコザック共通配列とを導入した5'プライマーおよび482番目のチロシンの後に停止コドンが導入されておりBamHI制限部位が導入されているリバースプライマーで増幅させた。結果として得られたPCR産物は、NheIおよびBamHIでこのPH20 PCR断片を消化後にプラスミドpIRESpuro2 (Clontech, Palo Alto, CA)中に連結した。

20

【 0 5 1 7 】

実施例-7

sHASEGPを発現する細胞系の作製

4mMグルタミンおよび18mlのPlurionic F68/L (Gibco)を添加したDHFR(-)細胞用のGIBCO 改変CD-CHO培地中で増殖している未トランスフェクトDG44 CHO細胞をトランスフェクションに備えて振盪フラスコ中に細胞 0.5×10^6 個/mlで蒔いた。この細胞を120rpmで振盪させながら5% CO₂の湿潤インキュベーター中にて37℃で増殖させた。指数関数的に増殖している未トランスフェクトDG44 CHO細胞をトランスフェクションの前に生存度について試験した。

30

【 0 5 1 8 】

未トランスフェクトDG44 CHO細胞培養物のうちの60,000,000個の生存細胞を沈殿させ、これを2×トランスフェクション用緩衝液(2×HeBS = 40mM Hepes、pH7.0、274mM NaCl、10mM KCl、1.4mM Na₂HPO₄、12mMデキストロース) 0.7ml中に細胞20,000,000個の密度に再懸濁させた。再懸濁細胞の各一定分注量に、直鎖状HZ24プラスミド(250 μg) 0.09mlを添加し、この細胞/DNA溶液を室温でギャップ長0.4cmのBTX (Gentronics)エレクトロポレーション用キュベット中に移した。陰性対照のエレクトロポレーションは、細胞と混合するプラスミドDNAをなしとして行った。この細胞/プラスミド混合物をコンデンサ放電330Vおよび960 μFによりまたは350Vおよび960 μFでエレクトロポレーションした。

40

【 0 5 1 9 】

エレクトロポレーション後に細胞をキュベットから取り出し、それを4mMグルタミンおよび18mlのPlurionic F68/L (Gibco)を添加したDHFR(-)細胞用の改変CD-CHO培地5ml中に移し、これを6-ウェル組織培養プレートのウェルに入れて5% CO₂の湿潤インキュベーター中にて37℃で2日間選択なしで増殖させた。

【 0 5 2 0 】

エレクトロポレーションから2日後、組織培養培地0.5mlを各ウェルから取り出し、これをヒアルロニダーゼ活性の存在について試験した。

【 0 5 2 1 】

50

HZ24をトランスフェクトしたDG44 CHO細胞のトランスフェクションから40時間後での初期のヒアルロニダーゼ活性

	希釈	活性 単位 /ml
トランスフェクション 1 330V	10倍希釈	0.25
トランスフェクション 2 350V	10倍希釈	0.52
陰性対照	10倍希釈	0.015

10

【 0 5 2 2 】

トランスフェクション2 (350V)由来の細胞を組織培養ウェルから回収し、計測し、1mLあたり生存細胞10,000~20,000個に希釈した。この細胞懸濁液の一定分注量0.1mLを5枚の96ウェル丸底組織培養プレートの各ウェルに移した。4mM Glutamax-1を含有し、ヒポキサンチンおよびチミジン補完物なしのCD-CHO培地(GIBCO) 0.1mLを、細胞を含む各ウェルに添加した(最終容量0.2mL)。

【 0 5 2 3 】

10クローンをメトトレキサートなしで増殖させた5枚のプレートから同定した。

20

プレート/ ウェル ID	相対的 ヒアルロニダーゼ 活性
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304

30

2D9	273
4D10	302
1E11	242
A1 (+) 対照	333
H12 (-) 対照	0

40

【 0 5 2 4 】

6個のHZ24クローンを培養で増やし、それらを単一細胞懸濁液として振盪フラスコ中に移した。クローン3D3、3E5、2G8、2D9、1E11、および4D10を2次元無限希釈法(two-dimensional infinite dilution strategy)により96ウェル丸底組織培養プレート中に蒔いた。希釈したクローンを、培養で最初の何日かに必要な増殖因子を供与するため、1ウェルあたり未トランスフェクトDG44 CHO細胞500個のバックグラウンド中で増殖させた。サブクローンあたりプレート10枚を作製した。

【 0 5 2 5 】

クローン3D3は目に見える24個のサブクローンをもたらした。有意なヒアルロニダーゼ

50

活性が24個のサブクローンのうちの8個由来の上清で測定され(>50単位/mL)、これらの8個のサブクローンを50nMメトトレキサートの存在下においてT-25組織培養フラスコ内で増やした。クローン3D3 50nMを500nMメトトレキサート中でさらに増やし、その結果、振盪フラスコ中に1,000単位/mlよりも多くを産生するクローン(クローン3D3 5M)を得た。

【0526】

実施例8

sHASEGPの産生

3D3 5Mのバイアルを解凍し、そのクローンをTフラスコから1Lスピナーフラスコを経て100nMメトトレキサートおよびGlutamax (Invitrogen)を添加したCHO CDM培地(Invitrogen, Carlsbad CA)中で増やした。細胞をスピナーフラスコから5 Lバイオリアクター(Braun)に1mlあたり生存細胞 4.0×10^5 個の植菌密度で移した。各パラメータは、溶存酸素設定値2.5%および空気層0~100cc/分で、温度設定値37℃、pH7.2(開始設定値)とした。168時間で、フィード#1培地(CD CHO + 50g/Lグルコース)250mlを添加した。216時間で、フィード#2培地(CD CHO + 50g/Lグルコース + 10mM酪酸ナトリウム)250mlを添加し、264時間でフィード#2培地250mlを添加した。このプロセスにより、細胞600万個/mlの最大細胞密度で1mlあたり1600単位の最終生産性が得られた。酪酸ナトリウムを添加は、産生の最終段階でsHASEGPの産生を劇的に促進させることが分かった。

【0527】

3D3-5M増殖およびsHASEGP産生、5Lバイオリアクター

稼働時間	生存細胞 $\times 10^5$	% 生存	単位 /ml	体積(mL)	[グルコース]	フィード
0	4.4	100	0	4500	547	
24	5.7	100	0	4500	536	
48	10.1	100	37	4500	501	
72	17.1	99	62	4500	421	
96	28.6	99	118	4500	325	
120	28.8	99	240	4500	274	
144	60.2	100	423	4500	161	
168	55	100	478	4500	92	250ml フィード#1
192	66.6	98	512	4750	370	
216	55.2	92	610	4750	573	250ml フィード#2
240	53	88	710	5000	573	
264	49.8	84	852	5000	474	250ml フィード#2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25.4	52	1676	5250	690	

【0528】

実施例9

sHASEGPの精製

3D3クローン由来のならし培地を深層ろ過および10mM HEPES pH7.0中への接線流れ透析ろ過により浄化した。次いで、可溶性HASEGPをQセファロース(Pharmacia)イオン交換クロマトグラフィー、フェニルセファロース(Pharmacia)疎水性相互作用クロマトグラフィー、フェニルポロネート(Prometix)クロマトグラフィーおよびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(Biorad, Richmond, CA)に対する連続的クロマトグラフィーにより精製した。

【0529】

sHASEGPをQセファロースに結合させ、400mM NaClの同一緩衝液で溶出させた。この溶出液を2M硫酸アンモニウムで希釈して終濃度500mM ASO_4 とし、フェニルセファロース(低置

換度)カラムに通し、続けて同一条件下でフェニルボレート樹脂に結合させた。このフェニルボレート樹脂からsHASEGPを、ASO₄が入っていない50mMピシンでpH9.0にて洗浄後にHepes pH6.9で溶出させた。この溶出液を5mM PO₄ 1mM CaCl₂でpH6.9にてセラミック系ヒドロキシアパタイト樹脂に負荷し、これを0.1mM CaCl₂が入った80mM PO₄ pH7.4で溶出させた。

【0530】

結果として得られた精製sHASEGPは、USP標準品を用いた微量濁度アッセイから65,000 USP単位/mgタンパク質を上回る特異活性を持っていた。精製sHASEGPはPharmacia 5RPCスチレンジビニルベンゼンカラムより0.1% TFA/H₂Oから0.1% TFA/90%アセトニトリル/10% H₂Oの勾配で24~26分に単一ピークとして溶出され、これはSDS電気泳動によりぼんやりとした61kDaの単一バンドとして分離された。このバンドはPNGase-Fを用いた処理によって、はっきりとした51kDaのバンドにまで小さくなった。N末端アミノ酸の配列決定により、そのリーダーペプチドが効率良く除去されていることが分かった。

【0531】

生化学的に精製したsHASEGPのN末端アミノ酸配列

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
理論	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
観測	-	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

【0532】

実施例10

DG44 CHO由来sHASEGPのグリコシル化の分析

異なる種由来のsHASEGPタンパク質はその触媒活性のためにグリコシル化を必要とするかどうかに関して、矛盾するデータが存在している。例えば、酵素的に活性なハチ毒ヒアルロニダーゼは、グリコシル化機構がない、すなわち大腸菌などの細胞で合成できるということが報告されている。さらに、精製ウシ精巢ヒアルロニダーゼをPNGaseで処理することで、酵素活性は不活化されなかった(Yamagata et al 1997)。その他の研究では、脱グリコシル化後の活性の消失を報告しており、およびジスルフィド結合がさらに必要になることを報告している。

【0533】

しかしながら、そのような過去の試験の全てが未精製または部分精製の製剤を用いて行われていたので、その活性の消失は、脱グリコシル化された酵素が未精製の製剤中に混入しているプロテアーゼにさらされた結果であったのか、またはグリコシル化と触媒活性との間の直接の機能的相関関係であったのかどうかは明らかではなかった。

【0534】

a. 手順

機能的なN-結合グリコシル化を無タンパク質条件下でCHOに基づく発現系によりヒトsHASEGPに導入できるかどうかを決定するため、ヒトsHASEGP-HIS6をコードするcDNAをIRES puroの2シストロン性カセットにより既知組成培地中のCHO細胞で発現させた。細胞をCHO CDM (Invitrogen/Gibco)中で72時間増殖させ、続けてこれを30kDaの分画膜を付けたPellicon TFFユニット(Millipore)に対し濃縮および接線流れ透析ろ過した。この濃縮液を10mM Hepes pH7.4 50mM NaClに置換した。次いで、この透析ろ過液をDEAE streamlineセファロース樹脂に負荷し、これをPharmacia FPLC樹脂に対し0~1M NaCl溶液のNaClの勾配で溶出させた。ヒトsHASEGPは10~30%のNaCl溶液に溶出した。カラム分画中のsHASEGPの量から、酵素の大部分が勾配10~30%のNaCl溶液中に回収されていたことが分かった。次いで、勾配10~30%のNaCl溶液由来の酵素をNiの電荷をもつIMAC樹脂に対するアフィニティークロマトグラフィーによりさらに精製した。ヒトsHASEGPをIMAC樹脂から、10mMイミジゾール(Imidazole)で洗浄後に50mM酢酸緩衝液pH5.0で溶出した。そのタンパク質を10mM Hepes pH7.4に対し濃縮し透析した。この高純度酵素は、ELISAに基づくビオチン化基質によ

るマイクロタイターアッセイにおいて1mMカルシウムおよび1mg/ml HSAの存在下で97,000単位/mgタンパク質の特異活性を有することが決定された。

【0535】

タンパク質の相対分子量の変化を検出するため、精製したヒトsHASEGPをPNGASEまたはノイラミニダーゼで一晩処理し、続けてこれをゲル電気泳動し、エレクトロトランスファーし、HRP結合抗His6モノクローナル抗体(Qiagen)およびECL検出によりウエスタンブロット分析した。

【0536】

b. 結果

ウエスタンブロット分析により、CHO細胞で産生されたヒトsHASEGPがPNGASE処理に感受性であることが分かった。ヒトsHASEGPの相対分子量から、このタンパク質が高度にグリコシル化されていることが明らかとなった。PNGASEで一晩完全に消化後、ヒトsHASEGPは単一種にまで低下していたことから、未消化バンドに見られる軽度の不均一性はN-結合糖残基によるものである可能性が確認された。PNGaseFによる部分消化により、一連の中間体が未処理のものから移動していることや処理を長くすると漸進的に移動することが示された。各バンドが7%ゲルではやや拡散していたが、少なくとも6種の異なるイソ型中間体を可視化することができた。

【0537】

sHASEGPをノイラミニダーゼで処理することにより、CHO細胞が実際にヒトシアル化sHASEGPを合成できることが明らかとなった。ノイラミニダーゼを用いた処理および7%ゲルのsHASEGPのウエスタンブロット分析によって、CHO由来のヒト組換えsHASEGPは未処理のsHASEGPと比べて移動度が約1~3kDaで移動していることが明らかとなった。このように、これは実質的にシアル化されたヒトsHASEGPの作製に関する最初の報告である。これは安定性についてもヒトsHASEGPの血清中半減期を促進させるのにも非常に価値がある。多くの種由来の天然の精子sHASEGPはシアル化されておらず、それらはシアル酸特異的レクチンと反応しないからである。

【0538】

sHASEGPのFACS分析

FACE分析による活性なsHASEGPのオリゴ糖の分析により、触媒的に活性なsHASEGPタンパク質のプロファイルを素早く決定することができる。

【0539】

手順

3D3 5Mクローン由来の精製ヒアルロニダーゼをFACE(登録商標)N-結合オリゴ糖プロファイリング(Prozyme)により評価した。オリゴ糖をN-グリカナーゼ(別名PNGase)を用いた酵素消化により128.7µgの糖タンパク質から切断し、これをフルオロフォアANTSにより標識し、これを電気泳動により分離した。オリゴ糖のバンドの相対位置は、移動距離を重合(DP)単位の度合いで指定するオリゴ糖の標準ラダーと並べて、試料および試料の希釈物を泳動することにより決定した。

【0540】

結果

ヒアルロニダーゼ試料に対するN-プロファイルは10本のバンドからなり、そのうちの6本(オリゴ糖の標準バンドG5~G12に付随して泳動)は9%を超える強度を有していた。さらに、標準バンドG9と並んで泳動していたバンドは最も強く、35%~46%の強度があった。

【0541】

sHASEGPオリゴ糖分析

10

20

30

40

sHASEGP オリゴ糖	重合の度合い	全体のうちの パーセント
1	15.64	1.2
2	13.68	3.4
3	11.61	10.0
4	10.04	10.4
5	8.37	35.4
6	7.32	9.7
7	6.14	9.0
8	5.57	12.4
9	3.84	2.3
10	3.26	0.5

10

20

【 0 5 4 2 】

実施例11

酵素活性に対するsHASEGPのN-結合グリコシル化の依存性

a. 手順

精製したHIS6 sHASEGPの試料を、ノイラミニダーゼおよびPNGASEを含有する緩衝液と50 mmオクチルグリコシドを入れておよび入れずに37 で一晩混合した。ウエスタンブロット分析から得られるゲル移動により、オリゴ糖類が除去されていることを検証した。

30

【 0 5 4 3 】

b. 結果

試料	U/ML
Rx なし	22.01
ノイラミニダーゼ 一晩 50mM オクチルグリコシド(OG)	23.57
PNGaseF 50mM OG有り	0.0
PNGaseF 50mM OG無し 一晩	10.74

40

【 0 5 4 4 】

実施例-12

硫酸化および非硫酸化グリコサミノグリカンに対するsHASEGPの活性

HAを用いたマイクロタイターに基づくアッセイに加えて、その他のグリコサミノグリカンまたはプロテオグリカンに対するsHASEGPの基質特異性は、その他のグリコサミノグリカンに対するsHASEGPの活性を決定するための精製基質を用いたゲルシフトアッセイにより試験することができる。ヒアルロニダーゼアッセイの多くは、新たな還元性N-アセチルアミノ基の生成(Bonner and Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752, 1966)、または粘度(De Saegui et al., Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967)もしくは濁度(Dor

50

fman and Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948)の消失の測定に基づくものである。精製基質を用いれば、これらの方法は全てエンドグルコサミン活性の有無を判定するには十分である。

【0545】

a. 手順

ゲルシフトアッセイ-精製基質を組換えsHASEGPと混合して、ゲル内での基質の移動の増加をもたらすエンドグルコシダーゼ活性について試験する。コンドロイチン硫酸A、アグリカンおよびDはCalbiochemから得た。ヒアルロナン(ヒト臍帯)、コンドロイチン硫酸C、デルマタン硫酸、およびヘパラン硫酸はCalbiochemから入手される。ヒト臍帯ヒアルロナンはICNから入手した。各試験基質は0.1mg/mlに希釈する。精製sHASEGPまたはそれと同程度のsHASEGP発現細胞由来ならし培地の試料10 μ lを所望の緩衝液に溶解した試験基質液90 μ lと混合し、これを37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートする。インキュベーション後、試料を試料用緩衝液(Tris EDTA pH8.0、プロモフェノールブルーおよびグリセロール)で中和し、続いてこれを15%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。このゲルを0.5%アルシアンブルーの3%氷酢酸液中で一晩染色し、続いて7%氷酢酸液中で脱色することによってグリコサミノグリカンを検出する。酵素の存在下および非存在下での基質移動度を比較することにより、分解について判定する。

10

【0546】

b. 結果

100単位のsHASEGP_{HIS6} 10 μ lを50 μ g/mlヒト血清アルブミンの入った10mM Hepes緩衝液90 μ lと、各種のグリコサミノグリカンまたはプロテオグリカンを10 μ g含有させて37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。電気泳動的分析後のアルシアンブルー染色により、コンドロイチン硫酸A、CおよびD、アグリカンならびにヒアルロナンでは単一種への移動度シフトの増加が示されたが、ヘパラン硫酸でもコンドロイチン硫酸Bでもそれが示されなかった。未消化のグリコサミノグリカンはゲルの中央にスミア状に泳動していたのに対し、その消化産物はアルシアンブルー染色の大部分がダイフロンに泳動し、少量の物質が漸進的ラダー状に泳動していることが示された。

20

【0547】

実施例-13 sHASEGPの活性化に対する金属イオンの作用

ヒトsHASEGPは、至適酵素活性にグリコシル化を必要とするのに加えて、至適酵素活性のために陽イオンで活性化されることが分かった。精製の過程で、sHASEGPは連続的クロマトグラフィーステップ後の特異活性が低いことが分かった。HIS6タグsHASEGPは、DEAE精製、その後の連続的Ni-IMAC精製により均一にまで精製されると、特異活性が非常に低くなることが分かった。IMAC樹脂は金属イオンをキレートすることができるので、各種の金属をsHASEGPに再び添加して相対的酵素活性を測定した。

30

【0548】

a. 手順

精製sHASEGPを0.1mMニッケル(Ni)、コバルト(Co)、亜鉛(Zn)、カルシウム(Ca)およびマグネシウム(Mg)と室温で2時間インキュベーションした後、続けてマイクロタイターに基づくアッセイでヒアルロニダーゼ活性を測定することにより試験した。

40

【0549】

b. 結果

金属塩添加物	中性活性 U/ml
添加物無し	11.909
100 uM Ni	6.0306
100 uM Co	8.972
100 uM Zn	3.7476
100 uM Ca	101.9892

10

【0550】

ヒアルロニダーゼ活性の顕著な増加がsHASEGPを0.1mMカルシウムまたは0.1mMマグネシウムとインキュベーションした後に認められた。このような活性化はその他の金属とのインキュベーション後には認められなかった。sHASEGPにカルシウムを添加することで、A280の測定に基づくと、その酵素の特異活性がタンパク質1mgあたり約97,000単位にまで増加した。次いで、カルシウムおよびマグネシウム金属の用量反応曲線を調べて、酵素に対する金属イオンの至適濃度を決定した。

mM 二価金属	[Ca ⁺⁺]	[Mg ⁺⁺]
100	1	1.3
10	108	104
1	169	164
0.1	123	78
0.01	59	18
0.001	47	13
0.0001	39	13
0.00001	55	15

20

30

【0551】

sHASEGPの活性化はマイクロモル程度で起ることが分かった。10mMを超える濃度はカルシウムおよびマグネシウムの両方で阻害性であった。酵素ではなく基質の非特異的活性化を排除するため、塩化カルシウムの10mM Hepes緩衝液を、マイクロタイタープレートに固定化したビオチン化基質とインキュベートし、続けてこれを洗浄した。カルシウムとプレインキュベートし洗浄してあるプレートに酵素を添加した場合には、活性化は認められなかった。この活性化をホスホリパーゼCにより放出された天然sHASEGPについても試験し、それによってカルシウムで同様に活性化が示されたことで、その活性化がカルボキシ末端のHIS6エピトープタグの人為的結果ではないことが確認された。

40

【0552】

実施例14

sHASEGPの活性化に対するアルブミンの作用

組換えrHUPH20および食肉処理場からの精巢に由来するヒアルロニダーゼの他の製剤の希釈には、至適活性用のカルシウムに加えてアルブミンが必要となることが分かった。

【0553】

a. 手順

ヒト血清アルブミン(ICN)をカルシウムの入った10mM Hepes緩衝液に希釈して、酵素活性に対するアルブミンタンパク質の作用を測定した。sHASEGPおよび市販の製剤による酵

50

素アッセイを1mM CaCl₂および1mg/mlヒト血清アルブミンの両方を使って試験した。

【0554】

b. 結果

アルブミンの存在下では、ヒアルロニダーゼ活性の活性化が高希釈度で認められた。この活性化が変性の阻止による結果であったのかまたはアルブミンが基質の利用能に影響を及ぼしたのかは明らかではなかった。したがって、好ましいヒトsHASEGPの製剤は、アルブミンとカルシウムまたはマグネシウムからなる金属塩とを含むことができる。

【0555】

実施例-15 インビボでの精製sHASEGPの活性の伝播

a. 手順

10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.1% Pluronicに溶解した精製sHASEGPを0.15M NaClの入った発熱物質がない水に0.5U/μlに希釈した。生理食塩水に終容量20μlとして連続的に希釈して、1回の注射につき計0.01、0.05、0.1単位のを供与した。トリパンブルー溶液20μlを添加して終容量40μlとし、これをケタミン/キシラジンの腹腔内投与により予め麻酔をかけておいたbalb^{Nu/Nu}マウスの各横腹の側面皮膚に皮下注射した。t=0からt=45分まで、マイクロキャリパーを使ってその色素面積を2方向から測定した。この面積をmm²として表した。対照として、中性活性はないが分泌はされる組換えヒトHYAL1を入れた。

【0556】

b. 結果

被験物質	45分の色素面積
A. 対照生理食塩水	51.5mm ²
B. sHASEGP 0.01U	76.8 mm ²
C. sHASEGP 0.05U	98.22mm ²
D. sHASEGP 0.10U	180.4mm ²
E. HYAL1 100U	67.48 mm ²

【0557】

実施例-16 sHASEGP活性拡散の速度

a. 手順

精製した組換えsHASEGP_{H1S6}を2分割量に分けた。一方は加熱蓋の付いたサーマルサイクラー中で15分間95℃まで加熱した。もう一方は室温のままにした。酵素活性の熱による不活化をマイクロタイターに基づく酵素アッセイで検証した。速度論的解析のため、熱不活化対天然原料について調べた。4単位の精製sHASEGPまたは等価な熱不活化物をトリパンブルー色素とともに皮下注射した。その面積を15分までの各時点で調べた。

【0558】

b. 結果

10

20

30

40

4 単位	4 単位 熱不活化
$t_{\text{注射後の時間(分)}}$	$t_{\text{注射後の時間(分)}}$
$t_0 = 52.38$	$t_0 = 50.58$
$t_3 = 116.51$	$t_3 = 65.48$
$t_{6.5} = 181.93$	$T_{6.5} = 63.87$
$t_{10} = 216.96$	$T_{10} = 65.80$
$t_{16} = 279.99$	$T_{16} = 74.3$

10

【 0 5 5 9 】

20

実施例 -17 sHASEGPにより分解された皮膚の障壁の回復

a. 手順

皮下投与後のsHASEGPで開口された細孔の再生時間を解明するため、2単位の精製sHASEGPまたは対照生理食塩水を $t=0$ で動物の対向する2側面部位に皮下注射し、続けて30分、60分および24時間でその同じ部位にトリパンブルーを注射した。注射後 $t=15$ 分での色素拡散の面積を各時点で記録し対照と比較した。

【 0 5 6 0 】

b. 結果

2 単位	対照生理食塩水
sHASEGP注射後の時間	sHASEGP注射後の時間
$t_{0.5\text{時間}} = 183$	$t_{0.5\text{時間}} = 54$
$t_1\text{時間} = 167$	$t_1\text{時間} = 50$
$t_{22\text{時間}} = 61$	$t_{22\text{時間}} = 48$

30

40

【 0 5 6 1 】

この結果は、皮膚の障壁が2単位の酵素の投与から24時間以内に再生することを実証している。

【 0 5 6 2 】

実施例 -18 sHASEGPにより開口されるチャンネルサイズの決定

ヒトsHASEGPは、小分子、すなわちトリパンブルー色素の拡散を可能とするのに十分な間質腔のチャンネルを開口することが示された。しかしながら、sHASEGPの存在下で拡散できた粒子のサイズに関し、上限が存在していたかは不明であった。

【 0 5 6 3 】

50

a. 手順

さまざまなサイズの蛍光分子を使用して、ヒトsHASEGPにより開口されるチャネルのサイズを決定した。平均分子量4,400および200万Daの蛍光デキストラン(Sigma)ならびに20ナノメートルから500ナノメートルまでの明確な直径をもつフルオレセイン標識ビーズ(Molecular Probes)を40 μ lの容量で皮下投与し、その後にsHASEGPまたは対照生理食塩水をその同じ部位に注射した。次いで、色素最前部までの面積を注射後15分で2方向から測定した。

【0564】

b. 結果

拡散剤	拡散試験の 粒子サイズ	15分での 面積	標準偏差
sHASEGP	4400 Da	84.2	25.7
対照	4400 Da	38.0	5.8
sHASEGP	2x10 ⁶ Da	141.2	4.5
対照	2x10 ⁶ Da	51.7	8.1
sHASEGP	20nm 直径	92.3	20.6
対照	20nm 直径	51.6	3.0
sHASEGP	100nm 直径	61.0	5.7
対照	100nm 直径	40.0	7.0
sHASEGP	200nm 直径	35.5	1.6
対照	200nm 直径	27.9	8.2
sHASEGP	500nm 直径	44.8	13.6
対照	500nm 直径	41.2	9.8

10

20

30

【0565】

この結果から、約1kDa (トリパンブルー)から直径が50nm (ラテックスビーズ)までの分子はsHASEGPの投与後にいっそうの拡散を示すことが実証された。ウシ血清アルブミン(66kDa)はトリパンブルーに対し同様の拡散速度を示したが、50nmのラテックスビーズは拡散するのにかなり多くの時間を要した。500nmのビーズは480分まで拡散を示さなかった。

【0566】

実施例-19 ヒトsHASEGPの皮下同時注射後のビオチン化抗体の血清薬物動態プロファイル

a. 手順

Balb/c雌マウスをケタミン/キシラジンの混合物で麻酔した。次いで、このマウスに生理食塩水20 μ lまたは活性4単位を含むsHASEGP 20 μ lと混合した0.5mg/mlビオチン化マウスIgG溶液20 μ lを皮下注射した。

【0567】

b. 結果

40

注射後の時間	対照	sHASEGP (4U)
血清 IgG t=0時間	0 ng/ml	0 ng/ml
血清 IgG t=2時間	0 ng/ml	360 ng/ml
血清 IgG t=51時間	4152 ng/ml	4176 ng/ml

【 0 5 6 8 】

この結果は、sHASEGPが循環系において大きな分子の血清分布の動態を増加させることを実証するものである。対照群では2時間でビオチン化IgGを検出することができなかったのに対し、sHASEGP群では2時間までに360ng/mlが認められた。

10

【 0 5 6 9 】

実施例-20 ヒトsHASEGPの静脈注射後の皮下注射分子の活性の伝播

a. 手順

各被験物質および対照媒体の投与ごとに色素注射用に4部位を使った。色素注射は静脈注射から45分後とした。各投与量の被験物質または対照物質を動物2匹に静脈注射した。酵素投与から45分後の色素最前部までの面積の測定値を各投与量または対照媒体に対し2.5、5、10および15分で算出した。

【 0 5 7 0 】

20

b. 結果

この結果から、高精製sHASEGPは静脈投与によって、末梢組織が全身的に利用できることを実証するものであった。全身投与されたsHASEGPの活性の伝播は投与量依存的であり、10単位の注射で対照媒体と区別できなくなった。

タイプ	静脈 投与量	時間(分)	平均面積 (mm ²)	標準偏差
PH20	1000	2.5	86.417	2.834193
PH20	1000	5	102.17	2.221146
PH20	1000	10	124.53	6.304944
PH20	1000	15	129.81	1.434319
PH20	300	2.5	59.137	7.218615
PH20	300	5	73.638	7.51197
PH20	300	10	87.092	8.686008
PH20	300	15	92.337	10.66466
PH20	100	2.5	56.308	7.741934
PH20	100	5	63.156	11.42052
PH20	100	10	76.519	16.18449
PH20	100	15	77.432	17.32264
PH20	30	2.5	50.534	10.64287
PH20	30	5	59.493	5.163971
PH20	30	10	68.102	11.00071
PH20	30	15	71.118	9.934212
PH20	10	2.5	36.4	3.807072
PH20	10	5	39.859	6.680932
PH20	10	10	45.649	4.44936
PH20	10	15	48.41	6.546835
対照	0	2.5	34.652	5.935037
対照	0	5	36.279	3.614544
対照	0	10	44.687	5.821216
対照	0	15	53.002	2.812439

10

20

30

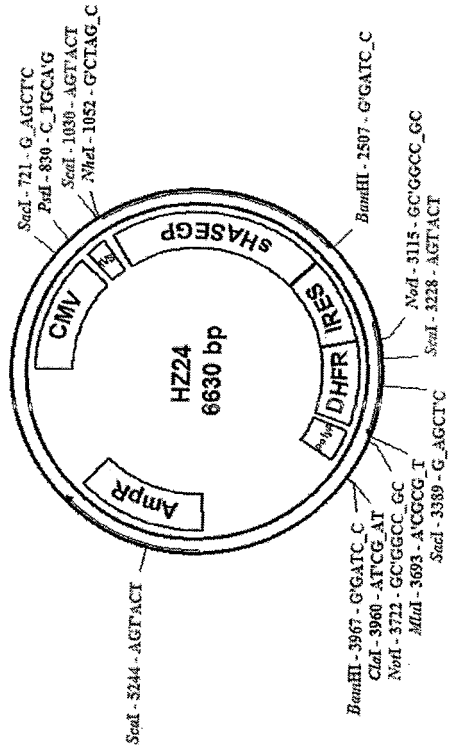
【図面の簡単な説明】

【0571】

【図1】 sHASEGPベクター-HZ24のベクターマップである。

40

【 1 】



【 配列表 】

0004464395000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/137 (2006.01)	A 6 1 K	31/137
A 6 1 K	31/445 (2006.01)	A 6 1 K	31/445
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1

(72)発明者 クンドゥ アニルバン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ アpartment 24 モンロー アベニ
 ュー 3535

(72)発明者 フロスト グレゴリー アイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デル マール メルカド ドライブ 13662

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表平06-503721(JP,A)
 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1993,90(21),p.10071-5
 Biol.Reprod.,1996,54(6),p.1343-9
 Matrix Biol.,2001,20(8),p.515-25
 FEBS Lett.,1993,336(3),p.545-8
 Dev.Biol.,1996,175(1),p.142-53

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

PubMed
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 WPI
 CAplus(STN)
 BIOSIS(DIALOG)