Ссылки на родственные заявки

Заявка на данное изобретение относит приоритет под номером 35 USC §119(e) к заявке с регистрационным номером 60/452360, поданной 5 марта 2003 г., которая включена в настоящую работу ссылкой во всей её полноте.

Область техники

Настоящее изобретение в основном относится к активным в нейтральных условиях растворимым гликопротеинам гиалуронидазы (neutral-active, soluble hyaluronidase glycoproteins, sHASEGP), их частям, в особенности к гиалуронидазным доменам. Более конкретно, изобретение относится к химическим модификациям, фармацевтическим композициям, экспрессирующим плазмидам, способам производства и терапевтическим способам, использующим гиалуронидазные гликопротеины и их домены, и к кодирующим молекулам нуклеиновой кислоты для терапевтической модификации гликозаминогликанов в лечении заболевания и для применения в целях усиления у животного диффузии других введённых инъекцией молекул, имеющих диаметр менее 200 нм.

Предшествующий уровень техники

Гликозаминогликаны (ГАГ) - это сложные линейные полисахариды внеклеточного матрикса (ВКМ), характеризующиеся повторяющимися дисахаридными структурами, состоящими из N-замещённого гексозамина и уроновой кислоты [гиалуронана (ГУ), хондроитин-сульфата (ХС), хондроитина (Х), дерматан-сульфата (ДС), гепаран-сульфата (ГС), гепарина (Г)] или галактозы [кератан-сульфата (КС)]. За исключением ГУ все оказываются ковалентно связанными с сердцевинными (капсидными) белками. ГАГ со своими сердцевинными белками в соответствии с их структурой относят к протеогликанам (ПГ).

Гиалуронан (ГУ) обнаруживается у млекопитающих преимущественно в соединительных тканях, коже, хрящах и синовиальной жидкости. Гиалуронан является также основной составляющей стекловидного тела глаза. В соединительной ткани связанная с гиалуронаном гидратная вода создаёт просветы между тканями, образуя окружение, способствующее перемещению и пролиферации клеток. Гиалуронан играет ключевую роль в биологических процессах, связанных с подвижностью клеток, включая быстрое развитие, регенерацию, репарацию, эмбриогенез, эмбриологическое развитие, залечивание ран, ангиогенез и онкогенез (развитие опухолей) (Toole //«Cell Biol. Extracell. Matrix». Под ред. Hay. Plenum Press, New York, 1991, p. 1384-1386; Bertrand et al. //Int. J. Cancer. 1992, v. 52, p. 1-6; Knudson et al. //FASEB J. 1993, v. 7, p. 1233-1241). Кроме того, уровень гиалуронана коррелирует с агрессивностью раковых опухолей (Ozello et al. //Cancer Res. 1960, v. 20, p. 600-604; Takeuchi et al. //Cancer Res. 1976, v. 36, p. 2133-2139; Kimata et al. //Cancer Res. 1983, v. 43, p. 1347-1354).

ГУ обнаружен во внеклеточном матриксе многих клеток, особенно в мягких соединительных тканях. ГУ выполняет различные физиологические функции, такие, как связанные с гомеостазом воды и белков плазмы (Laurent T.C. et al. //FASEB J. 1992, v. 6, p. 2397-2404). Продукция ГУ повышается в пролиферирующих клетках и может играть роль в митозе. Он участвует также в подвижности клеток и клеточной миграции. По-видимому, ГУ играет важную роль в регуляции, развитии и дифференцировке клеток (Laurent et al., см. выше).

ГУ использовался в клинической медицине. Была доказана полезность его тканезащитных и реологических свойств в офтальмологической хирургии для защиты эндотелия роговицы в ходе операций катаракты. Сывороточный ГУ является диагностическим показателем при заболеваниях печени и различных воспалительных болезненных состояниях, таких как ревматоидный артрит. Интерстициальный отёк, вызванный накоплением ГУ, может приводить к дисфункции различных органов (Laurent et al., см. выше).

Взаимодействия гиалуронана с белком вовлечены также в формирование структуры внеклеточного матрикса или «базового вещества» (ground substance).

Гиалуронидазы представляют собой группу активных в нейтральных или кислотных условиях ферментов, которые обнаруживаются во всем животном царстве. Гиалуронидазы различаются по субстратной специфичности и механизму действия.

Существуют три основных класса гиалуронидаз:

1. Гиалуронидазы млекопитающих (КФ 3.2.1.35), которые представляют собой эндо-бета-N-ацетилгексозаминидазы с тетрасахаридами и гексасахаридами в качестве конечных продуктов. Они имеют как гидролитическую, так и трансгликозидазную активности и могут расщеплять гиалуронан и хондроитинсульфаты (CS), особенно C4-S и C6-S.

2. Бактериальные гиалуронидазы (КФ 4.2.99.1), которые расщепляют гиалуронан и, до различной степени, CS и дерматан-сульфат (DS). Они представляют собой эндо-бета-N-ацетилгексозаминидазы, которые осуществляют реакцию бета-отщепления, где конечными продуктами являются в основном дисахариды.

3. Гиалуронидазы (КФ 3.2.1.36) из пиявок, других паразитов и ракообразных, которые являются эндо-бета-глюкуронидазами и дают в качестве конечных продуктов тетрасахариды и гексасахариды путём гидролиза бета 1-3 связи.

Гиалуронидазы млекопитающих могут быть далее подразделены на две группы: ферменты, активные в нейтральных условиях и активные в кислотных условиях. В геноме человека имеется шесть генов,

подобных генам гиалуронидазы: HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 и PH20/SPAM1.

HYALP1 - это псевдоген, а у продукта HYAL3 не было обнаружено никакой ферментативной активности в отношении любых известных субстратов.

Продукт HYAL4 представляет собой хондроитиназу и не обладает активностью в отношении гиалуронана.

Продукт HYAL1 - это прототип фермента, активного в кислотных условиях, а продукт PH20 - прототип фермента, активного в нейтральных условиях.

Активные в кислотных условиях гиалуронидазы, такие как HYAL1 и HYAL2, утрачивают каталитическую активность при нейтральном pH. Например, HYAL1 не обладает каталитической активностью in vitro при pH выше 4,5 (Frost et al. //Anal. Biochemistry. 1997). HYAL2 представляет собой фермент, активный в кислотных условиях, с очень низкой специфической активностью in vitro.

Гиалуронидазоподобные ферменты можно также разделить на те, которые закреплены в плазматической мембране с помощью гликозилфосфатидил-инозитольного (GPI) якоря, такие как HYAL2 и PH20 человека (Danilkovitch-Miagkova et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003, v. 100, № 8, p. 4580-4585; Phelps et al. //Science. 1988), и такие, которые растворены, как HYAL1 человека (Frost et al. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, v. 236, № 1, p. 10-15). Однако от вида к виду наблюдаются вариации: например, PH20 крупного рогатого скота очень слабо прикреплена к плазматической мембране и не зацеплена чувствительным к фосфолипазе якорем (Lalancette et al. //Biol. Reprod. 2001, v. 65, № 2, p. 628-636). Эта уникальная особенность бычьей гиалуронидазы позволила использовать растворимый фермент гиалуронидазу из бычьих семенников в виде экстракта для клинического применения (Wydase®, Hyalase®). Другие виды PH20 являются заякоренными в липиде ферментами, которые не могут быть растворены без применения детергентов или липаз. Например, PH20 человека заякорен в плазматической мембране через GPI. Попытки создать конструкции ДНК для PH20 человека, не внедряющие липидный якорь в полипептид, приводили к получению либо каталитически неактивного, либо нерастворимого фермента (Arming et al. //Eur. J. Biochem. 1997, v. 247, № 3, p. 810-814). Существующая в природе гиалуронидаза из спермы макак обнаружена и в растворимой, и в связанной с мембраной формах. В то время как связанная с мембраной форма с молекулярной массой 64 кДа обладает ферментативной активностью при pH 7,0, форма 54 кДа активна только при pH 4,0 (Cherr et al. //Dev. Biol. 1996, v. 175, № 1, p. 142-153). Таким образом, растворимые формы PH20 часто теряют ферментативную активность при нейтральных условиях.

Хондроитиназы - это ферменты, имеющиеся во всём животном мире. Эти ферменты расщепляют гликозаминогликаны по механизму эндогликозидазной реакции. Конкретные примеры известных хондроитиназ включают в себя

хондроитиназу ABC (получаемую из Proteus vulgaris: заявка на японский патент, регистрационный номер 6-153947, Yamagata T., Saito H., Habuchi O., Suzuki S. //J. Biol. Cftem. 1968, v. 243, p. 1523; Suzuki S., Saito H., Yamagata T., Anno K., Seno N., Kawai Y., Furuhashi T. //J. Biol. Chem. 1968, v. 243, p. 1543);

хондроитиназу AC (получаемую из Flavobacterium heparinum: Yamagata T., Saito H., Habuchi O., Suzuki S. //J. Biol. Chem. 1968, v. 243, p. 1523);

хондроитиназу ACII (получаемую из Arthrobacter aurescens: Hiyama K. and Okada S. //J. Biol. Chem. 1975, v. 250. p. 1824; Hiyama K. and Okada S. //J. Biochem. (Tokyo). 1976, v. 80, p. 1201);

гиалуронидазу ACIII (получаемую из Flavobacterium sp. Hp102: Miyazono H., Kikuchi H., Yoshida K., Morikawa K., Tokuyasu K. //Seikagaku. 1989, v. 61, p. 1023);

хондроитиназу B (получаемую из Flavobacterium heparinum: Michelacci Y.M. and Dietrich C.P. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974, v. 56, p. 973; Michelacci Y.M. and Dietrich C.P. //Biochem. J. 1975, v. 151, p. 121; Maeyama K., Tawada A., Ueno A., Yoshida K. //Seikagaku. 1985, v. 57, p. 1189);

хондроитиназу C (получаемую из Flavobacterium sp. Hp102: Miyazono H., Kikuchi H., Yoshida K., Morikawa K., Tokuyasu K. //Seikagaku. 1989, v. 61, p. 1023) и подобные им.

Гликопротеины состоят из полипептидной цепи, ковалентно связанной с одним или более углеводными фрагментами. Имеются две обширные категории гликопротеинов, которые содержат углеводы, сшитые с белковой составной частью либо N-гликозидной связью, либо O-гликозидной связью. N- и O-связанные гликаны присоединены к полипептидам через соответственно аспарагин-N-ацетил-D-глюкозамин и серин(треонин)-N-ацетил-D-галактозамин. Комплекс N-связанных олигосахаридов не содержит концевых маннозных остатков. Они содержат только концевые остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы и/или сиаловой кислоты. Гибридные олигосахариды содержат концевые маннозные остатки, а также концевые остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы и/или сиаловой кислоты.

Что касается гликопротеинов с N-связью, олигосахаридный предшественник присоединяется к аминогруппе аспарагина в ходе пептидного синтеза в эндоплазматической сети (эндоплазматическом ретикулуме). Затем олигосахаридный фрагмент последовательно обрабатывается серией специфических ферментов, которые удаляют и добавляют фрагменты молекулы сахара. Процессинг происходит в эндоплазматическом ретикулуме и продолжается при прохождении сквозь цис-, промежуточный и транс-аппарат Гольджи.

Сущность изобретения

В настоящей работе предусматриваются представители семейства растворимых гиалуронидазных гликопротеинов, активных в нейтральных условиях, в частности растворимых гиалуронидазных гликопротеинов PH-20 человека (называемых здесь также sHASEGP). Предусмотренный в настоящей работе sHASEGP является представителем семейства sHASEGP, обозначаемым как sHASEGP. Предусматривается также растворимый гиалуронидазный домен и его применение.

Изобретение основывается на открытии того, что высокий уровень продукции активной в нейтральных условиях растворимой гиалуронидазы может быть получен в экспрессирующей системе млекопитающих путём введения нуклеиновых кислот, лишённых узкой области, кодирующей в кДНК PH20 человека аминокислоты карбоксильного конца. Предусматриваются также дополнительные модификации sHASEGP для повышения секреции с использованием ненативных лидерных пептидов. Далее предусматриваются также способы модификации sHASEGP для продления его времени полужизни путём маскировки белка полиэтиленгликолем и посттрансляционных модификаций в направлении нативного гликозилирования. Ранее производившиеся попытки получить секретируемый активный в нейтральных условиях sHASEGP человека оказались безуспешными. Был сделан вывод, что усечения полипептида человеческого sHASEGP приводят к утрате и ферментативной активности в нейтральных условиях и способности клеток секретировать рекомбинантный белок в экспрессирующих системах млекопитающих (Arming et al. //Eur. J. Biochem. 1997, v. 247, № 3, p. 810-814). Крайне необходимым является создание активного в нейтральных условиях секретируемого sHASEGP для коммерческого производства и для терапевтического применения в качестве гиалуронидазы. Эти проблемы преодолеваются раскрываемым здесь изобретением.

Далее настоящим изобретением предусмотрен каталитически активный гликопротеин sHASEGP человека, причём sHASEGP содержит по меньшей мере один N-связанный сахарный фрагмент. Приведённые в настоящей работе исследования показывают, что для каталитической активности PH20 человека требуется наличие N-связанных гликанов, тогда как гиалуронидазы крупного рогатого скота и пчелиного яда остаются активными и без таких N-связанных гликанов. Гиалуронидазный домен человека, лишённый N-связанных фрагментов, каталитически неактивен. Поэтому классическая технология рекомбинантной ДНК не позволяет получить продукцию каталитически активного человеческого sHASEGP в отличие от sHASEGP пчелиного яда, который можно продуцировать в E. coli.

Изобретение включает способы и клетки для получения гликопротеинового полипептида sHASEGP с N-связью путём использования клеток, способных вводить указанные N-связанные фрагменты, или путём введения указанных N-связанных фрагментов в полипептид sHASEGP. Далее раскрываются способы идентификации надлежащим образом гликозилированных sHASEGP.

Предусматриваются также каталитически активные сверхсиалированные гликопротеины sHASEGP. Сверхсиалированные sHASEGP имеют более длительные времена полужизни в сыворотке в сравнении с природными sHASEGP из семенников быка и барана и поэтому они предпочтительны и для повышения ферментативной стабильности и для применения в качестве внутривенно вводимых лекарств. Изобретение предусматривает способы получения сверхсиалированных sHASEGP, композиции и применение.

Предусматриваются также белки, кодируемые полученными сплайсингом вариантами последовательностей для sHASEGP, дефицитными по природному якорю GPI.

Далее предусматриваются композиции sHASEGP, содержащие растворимый гликопротеин sHASEGP с ионом металла, причём ион металла представляет собой ион кальция, магния или натрия. Оптимум активности sHASEGP достигается в присутствии указанных металлов. Предусматриваются также композиции, состоящие из sHASEGP в присутствии указанных ионов металлов.

Предусматриваются модификации sHASEGP для дополнительного продления полужизни. Предусматриваются химические модификации sHASEGP полимерами, такими как полиэтиленгликоль и декстран. Такие модификации защищают (экранируют) sHASEGP от выведения через циркуляцию в кровотоке и от иммунной системы, а также от чувствительных к гликосиалированию рецепторов для маннозы и асиалогликопротеинов. Далее предусматриваются способы присоединения к специфическим функциональным группам, таким как сайты гликозилирования, положительно заряженные аминогруппы и цистеины.

В настоящей работе также предусматриваются способы анализа для идентификации эффекторов, таких как вещества, в том числе малые молекулы, и условий, таких как pH, температура и ионная сила, которые модулируют активацию, экспрессию или активность sHASEGP. В приводимых для примера анализах оценивается влияние испытуемых соединений на способность гиалуронидазного домена sHASEGP расщеплять известный субстрат, как правило, гликозаминогликан или протеогликан. Агенты, обычно соединения, в особенности малые молекулы, которые модулируют активность гиалуронидазного домена, являются соединениями-кандидатами для модулирования активности sHASEGP. Гиалуронидазные домены могут быть также применены для получения специфичных к гиалуронидазе антител, функция которых заключается в нарушении активности. Предусматриваемые здесь гиалуронидазные домены включают (но не ограничиваются ими) N-концевой гликозилгидролазный домен с усечёнными С-концевыми частями его, проявляющий каталитическую активность in vitro.

Предусматриваются также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки и гиалуронидазные домены, молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют растворимый гиалуронидазный домен или его каталитически активные части, а также те молекулы, которые кодируют sHASEGP полной длины. Нуклеиновая кислота, кодирующая гиалуронидазный домен, и нуклеотидная кислота противоположного направления представлены далее последовательностью SEQ ID NO: 6; а гиалуронидазный домен sHASEGP представлен далее последовательностью SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 35-464). Белковая последовательность аминокислот и последовательность кодирующей нуклеиновой кислоты для sHASEGP полной длины представлены далее как последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6.

Предусматриваются также молекулы нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются с такой кодирующей sHASEGP нуклеиновой кислотой по всей их полной длине или вдоль по меньшей мере 70, 80 или 90% от их полной длины, и кодирующие гиалуронидазный домен или его часть. Гибридизация обычно проводится при условиях, по меньшей мере, низкой, как правило, по меньшей мере, умеренной, и часто высокой степени строгости.

Изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК, включающий геномную ДНК или кДНК, или представляет собой РНК, или может включать другие компоненты, такие как пептидонуклеиновую кислоту или другие нуклеотидные аналоги. Изолированная нуклеиновая кислота может включать дополнительные компоненты, такие как гетерологичные или нативные промоторы, и иные последовательности, регулирующие транскрипцию или трансляцию. Эти гены могут быть присоединены к другим генам, таким как репортерные гены или другие индикаторные гены или гены, кодирующие индикаторы.

Предусматривается также изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность таких молекул, которые комплементарны нуклеотидной последовательности, кодирующей sHASEGP или его часть.

Предусматриваются также фрагменты изолированной молекулы нуклеиновой кислоты или олигонуклеотиды, которые могут быть использованы в качестве зондов или праймеров и которые содержат по меньшей мере примерно 10, 14, 16 нуклеотидов, обычно количество нуклеотидов менее 1000, или же менее 100, или равно 100, эти фрагменты представлены далее последовательностью SEQ ID NO: 6 (или комплементарной ей последовательностью); или эти фрагменты содержат по меньшей мере 30 нуклеотидов (или комплементарную им последовательность), или они содержат олигонуклеотиды, которые гибридизируются по всей своей полной длине (или по меньшей мере на 70, 80 или 90% своей полной длины) с любыми из таких фрагментов или олигонуклеотидов. Длина фрагментов зависит от цели, для которой они используются и/или от сложности представляющего интерес генома. Как правило, зонды и праймеры содержат менее чем примерно 50, 150 или 500 нуклеотидов.

Предусматриваются также плазмиды, содержащие любую из указанных молекул нуклеиновой кислоты. Предусматриваются также клетки, содержащие плазмиды. Такие клетки включают (но не ограничиваются ими) бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки грибов, растительные клетки, клетки насекомых и клетки животных.

Предусматриваются также системы млекопитающих с усиленной экспрессией, использующие сигнальные лидерные последовательности, способные эффективно секретировать sHASEGP. Пример аминокислотной последовательности такого лидерного пептида с эффективной секрецией и слитого белка с sHASEGP представлен в последовательностях SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 46.

Предусматривается также способ продукции sHASEGP путём выращивания описанных выше клеток в условиях, когда sHASEGP экспрессируется клетками, и выделения экспрессированного полипептида или гликопротеина sHASEGP. Предусматриваются также способы выделения нуклеиновой кислоты, кодирующей другие sHASEGP.

Предусматриваются также клетки, как правило клетки эукариот, такие, как клетки млекопитающих и дрожжевые клетки, в которых полипептид sHASEGP экспрессируется на поверхности клеток. Такие клетки используют в тестах по скринингу лекарств для идентификации соединений, модулирующих активность полипептида sHASEGP. В этих тестах, в том числе тестах на связывание in vitro и тестах на основе транскрипции, в которых происходит прямое или косвенное влияние на передачу сигнала, как, например, через активацию факторов стимуляции роста, оценивается действие sHASEGP.

Предусматриваются также пептиды, кодируемые такими молекулами нуклеиновой кислоты. Среди этих пептидов - гиалуронидазный домен sHASEGP или полипептид с такими аминокислотными заменами, когда специфичность и/или гиалуронидазная активность существенно не изменяются. В частности, предусматривается существенно очищенный гликопротеин sHASEGP млекопитающего, который включает секретируемый гиалуронидазный домен, каталитически активный в нейтральных условиях.

Изобретение включает также каталитический гиалуронидазный домен и может дополнительно включать другие домены. sHASEGP может образовывать гомодимеры и может также образовывать гетеродимеры с некоторыми другими белками, такими, как связанные с мембранами белки. Предусматривается также, по существу, очищенный гликопротеин, включающий последовательность аминокислот, имеющую степень идентичности с sHASEGP по меньшей мере 60, 70, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, где процент идентичности определяется с помощью стандартных

алгоритмов и отбрасывания пробелов, максимизирующего процент идентичности.

Здесь рассматриваются полученные сплайсингом варианты sHASEGP, в особенности те, которые содержат каталитически активный гиалуронидазный домен.

В других формах осуществления настоящего изобретения предусматриваются, по существу, очищенные полипептиды, которые включают гиалуронидазный домен полипептида sHASEGP или его каталитически активную часть, но не включают полную аминокислотную последовательность, представленную далее как последовательность SEQ ID NO: 1. Среди них полипептиды, включающие последовательность аминокислот, имеющие степень идентичности с последовательностями SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 100%.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривается нуклеиновая кислота, которая кодирует эукариотический гиалуронидазный гликопротеин, обозначенный sHASEGP. В частности, нуклеиновая кислота включает последовательность нуклеотидов, указанную далее в последовательности SEQ ID NO: 6, особенно указанную далее как нуклеотиды 106-1446 последовательности SEQ ID NO: 6, или же её часть, кодирующую каталитически активный полипептид.

Предусматриваются также молекулы нуклеиновой кислоты, которые гибридизируются при условиях, по меньшей мере, низкой степени строгости, обычно при условиях умеренной степени строгости и более типично при условиях высокой степени строгости, с последовательностью SEQ ID NO: 6 или её вырожденными производными.

В одном из осуществлений настоящего изобретения изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты гибридизируется с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную далее в последовательности SEQ ID NO: 6 (или её вырожденные производные) при условиях высокой степени строгости. sHASEGP полной длины указан далее в последовательности SEQ ID NO: 1 и кодируется последовательностью SEQ ID NO: 6 или её вырожденными производными.

Предусматриваются также мутеины (мутантные белковые формы) гиалуронидазного домена sHASEGP, в частности такие мутеины, в которых остаток Cys в гиалуронидазном домене, являющийся свободным (т.е. не образующий дисульфидных связей ни с каким из других остатков Cys в гиалуронидазном домене), замещён другой аминокислотой, как правило (хотя и не обязательно), такая аминокислотная замена является консервативной заменой или такой заменой, которая не нарушает активность, и мутеины, в которых удалён (или удалены) специфический сайт (или сайты) гликозилирования.

В настоящей работе предусматриваются полипептиды sHASEGP, в том числе (но не ограничиваясь ими) полученные сплайсингом его варианты, и нуклеиновые кислоты, кодирующие sHASEGP, и их домены, производные и аналоги. Предусматриваются также одноцепочечные секретируемые гиалуронидазные гликопротеины, имеющие N-конец, функционально эквивалентный тем, которые создаются активацией сигнальной пептидазы с образованием sHASEGP. Существуют семь сайтов потенциально возможного N-связанного гликозилирования в положениях N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 sHASEGP, как для примера приведено в последовательности SEQ ID NO: 1. Между цистеиновыми остатками Cys C60-C351 и остатками Cys C224-C238 образуются дисульфидные связи, формируя сердцевину гиалуронидазного домена sHASEGP. Однако для каталитической активности фермента в нейтральных условиях необходимы дополнительные цистеины в карбоксильном конце, так что sHASEGP с аминокислотами от № 36 до Cys464 в последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой минимальный активный гиалуронидазный домен sHASEGP человека. Таким образом, сайт N-связанного гликозилирования N490 не нужен для полноценной активности sHASEGP.

Гликозилирование sHASEGP с N-связью играет решающую роль для их каталитической активности и стабильности. В то время как изменение типа гликана, модифицирующего гликопротеин, может очень сильно влиять на антигенность, структурное сворачивание, растворимость и стабильность белка, существует мнение, что для оптимальной ферментативной активности большинства ферментов гликозилирование не требуется. Таким образом, sHASEGP являются в этом смысле уникальными, так как удаление N-связанного гликозилирования может приводить к почти полной инактивации гиалуронидазной активности. Присутствие N-связанных гликанов является решающим для создания активного sHASEGP. Сюда включены системы экспрессии белка, пригодные для введения в sHASEGP важных N-связанных гликозилирующих остатков. Дополнительно включено введение дегликозилированного полипептида sHASEGP в присутствии экстрактов, способных присоединять N-связанные гликаны. В одном из аспектов изобретения описывается также комплексное гликозилирование, завершающееся сиалированием, но рассматриваются и другие случаи, когда гликозилирование завершается свободными остатками маннозы. Предпочтительно в концевых остатках N-связанного гликозилирования на sHASEGP находятся остатки сиаловой кислоты.

N-связанные олигосахариды распадаются на несколько главных типов (олигоманнозные, комплексные, гибридные, сульфированные), которые все имеют сердцевины $(Man)_3$-GlcNAc-GLcNAc-, присоединённые через атом амидного азота в остатках Asn, находящихся в пределах последовательностей -Asn-Xaa-Thr/Ser-(где Xaa - это не Pro). Гликозилирование в сайте -Asn-Xaa-Cys- было описано для коагуляционного белка С. Часто сайты с N-связью косвенно различимы по появлению «пустого» цикла при секвенировании. Позитивная идентификация может быть осуществлена после высвобождения олигоса-

харида ферментом PNGазой (пептид-N-гликозидазой) F, которая превращает гликозилированный Asn в Asp. После удаления PGNазы F N-связанные олигосахариды могут быть очищены с помощью хроматографии на биогеле P-6, а олигосахаридный пул подвергается препаративной анионообменной хроматографии при высоком pH (high pH anion exchange chromatography, HPAEC) (Townsend et al. //Anal. Biochem. 1989, v. 182, p. 1-8). С помощью HPAEC можно разделить некоторые изомеры олигосахаридов. На хроматограммах HPAEC остатки фукозы смещаются к более раннему элюированию, тогда как остатки дополнительной сиаловой кислоты выходят при большем времени элюирования. Путём сопутствующей обработки гликопротеинов с известной олигосахаридной структурой (например, фетуин крупного рогатого скота, кислый гликопротеин α-1, овальбумин, РНКаза B, трансферрин) можно улучшить идентификацию олигосахаридных пиков. Собранные олигосахариды можно охарактеризовать, сочетая анализы состава и метилирующих связей (Waeghe et al. //Carbohydr. Res. 1983, v. 123, p.281-304), различая аномерные конфигурации с помощью спектроскопии ЯМР (Van Halbeek //Methods Enzymol. 1993, v. 230).

Предусматриваются также композиции, содержащие sHASEGP. Композиции, содержащие sHASEGP могут быть составлены в лиофилизованной форме или как стабилизированные растворы. Для оптимальной активности при нейтральных pH полезны композиции, содержащие ионы специфических металлов, таких как кальций, магний или натрий. Кроме композиций в виде стабилизированных растворов, в настоящей работе рассматриваются также композиции с медленным высвобождением, пригодные для пролонгированного выделения гликозаминогликанов. В настоящей работе предусматриваются также наборы для введения малых объёмов sHASEGP при процедурах внутриглазной хирургии и других процедур с введением малых объёмов. Наборы представляют собой предварительно наполненные шприцы с sHASEGP. Предусматриваются также композиции со сбалансированным солевым составом для применения ex vivo в процедурах технологии искусственного оплодотворения.

Предусматриваются также способы применения sHASEGP для удаления гликозаминогликанов. sHASEGP открывает каналы в интерстициальном пространстве путём разрушения гликозаминогликанов, что даёт возможность диффундировать молекулам, имеющим размер менее 500 нм. Эти каналы продолжают существовать в течение 24-48 ч, в зависимости от дозы и типа композиции. Такие каналы могут быть использованы для усиления диффузии добавленных извне молекул, таких как жидкости, небольшие молекулы, белки, нуклеиновые кислоты, векторы для генотерапии и другие молекулы размером менее 500 нм.

sHASEGP может быть также применён для удаления избытка гликозаминогликанов, таких как возникающие после повторной ишемической перфузии, воспаления, артериосклероза, водянки, рака, травмы спинного мозга и других форм рубцевания. В некоторых случаях sHASEGP может вводиться системно путём внутривенного вливания. Это может быть полезно тогда, когда местное введение невозможно как в случае сердца или мозга, или в случае рассеянной неоплазии, когда заболевание охватывает всё тело. Сверхсиалированные sHASEGP предпочтительны для увеличения времени полужизни в сыворотке и улучшения распространения в организме по сравнению с природными гиалуронидазными ферментами, лишёнными концевых сиаловых кислот.

В некоторых случаях, таких как повреждение спинного мозга, глаукома и косметические процедуры, предпочтительно длительное введение.

При других симптомах предпочтительна однократная доза с кратким действием. Кратковременное удаление гликозаминогликанов можно применять для усиления доставки растворов и лекарств в интерстициальные промежутки. Это может быть полезно для диффузии анестетиков и для введения терапевтических жидкостей, молекул и белков. Подкожное и внутримышечное введение молекул в присутствии sHASEGP также быстрее способствует их системному распределению. Такие способы чрезвычайно полезны, когда внутривенное введение невозможно или когда необходима более быстрая системная доставка молекул. Для доставки других больших молекул, таких как фактор VIII, которые при подкожном введении имеют низкую биологическую доступность, можно осуществлять инъекцию вместе с sHASEGP, чтобы повысить их доступность.

Предусматриваются также способы применения sHASEGP для ферментативного удаления скопившегося матрикса («кумулюс матрикс»), окружившего овоциты. Удаление скопившегося матрикса с помощью очищенного sHASEGP, не содержащего токсических примесей, характерных для полученных из экстрактов гиалуронидаз, обеспечивает более мягкую процедуру получения овоцитов с повышенной выживаемостью. Кроме того, производство sHASEGP может осуществляться без использования экстрактов из организма крупного рогатого скота или других организмов, которые содержат вирусы и другие патогены, такие как агенты передаваемых губкообразных энцефалопатии.

Для малых пространств также могут быть применены инъекции малых объёмов sHASEGP, предназначенные для внутриглазного применения. sHASEGP могут быть инъецированы в переднюю камеру глаза для удаления избытка вязкоупругих субстратов, вводимых в ходе хирургических операций. Внутриглазные инъекции sHASEGP можно также применять для снижения внутриглазного давления при глаукоме, для растворения в стекловидном теле агрегатов (или «скитальцев», «floaters»), для очистки стекловидного тела от кровоподтёков, для лечения (рассасывания) пятен на роговице, для помощи при отслойке сетчатки в случаях диабетической ретинопатии и для смешивания с другими ферментами с це-

лью корректировки формы роговицы для улучшения её облегания корректирующими линзами. Следует учитывать, что в некоторых случаях может быть желательно применение sHASEGP длительного действия, такого как модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГ), «ПЭГилированного» sHASEGP.

Можно предвидеть также совместные композиции sHASEGP с другими веществами для пригодных к инъекции доз, предназначенных для введения малого объёма или для быстрого подкожного введения. Для примера в композиции Epipen® могут быть объединены инсулин и другие жидкости. Способы данного изобретения включают введение полипептида sHASEGP или фармацевтических композиций, содержащих sHASEGP, до, одновременно или после введения других терапевтических молекул. Можно ввести sHASEGP в месте, отличном от места введения терапевтической молекулы, или же sHASEGP может быть введён в том же самом месте, что и терапевтическая молекула.

Итак, в настоящей работе предусматривается семейство секретируемых эукариотами активных в нейтральных условиях гиалуронидазных гликопротеинов, обозначенных sHASEGP, и их функциональных доменов, особенно их гиалуронидазных (или каталитических) доменов, мутеинов и других их производных и аналогов. Предусматриваются здесь также нуклеиновые кислоты, кодирующие sHASEGP. Дополнительно предусматриваются композиции и способы терапевтического применения указанных sHASEGP для лечения заболеваний и для использования в качестве ферментов, модифицирующих ткани.

Краткое описание графических материалов

На чертеже фигуры представлена карта вектора HZ24 для sHASEGP.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

А. Определения

Если не определено иное, все использованные здесь технические и научные термины имеют такое же значение, как обычно понимается специалистами в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки и печатные публикации, последовательности банка данных Genbank, вебсайты и другие опубликованные материалы, на которые производятся ссылки на протяжении всего этого описания, если это не определено иным образом, включены в настоящую работу ссылкой во всей их полноте. В том случае, когда для используемых здесь терминов существует несколько определений, предпочтение отдаётся определениям, приводимым в этом разделе.

Если сделана ссылка на URL или иной подобный идентификатор или адрес, понятно, что такие идентификаторы могут меняться и что конкретная информация в Интернете может появляться и исчезать, однако поиском в Интернете может быть найдена эквивалентная информация. Ссылка на это свидетельствует о доступности и открытом распространении такой информации.

Сокращения для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, как они использованы в настоящей работе, находятся, если не указано иное, в согласии с их общепринятым использованием, легко поддающимися расшифровке сокращениями или рекомендациями Комиссии по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (см. Biochem. 1972, v. 11, p. 942-944).

Термин «гиалуронидаза эукариот», как он использован в настоящей работе, относится к семейству разнообразных гликозаминогликан-эндоглюкозаминидаз, причём остаток глутамата в гиалуронидазе гидролизует бета-1,4 связи в гиалуронане и хондроитин-сульфатах по кислотно-щелочному механизму катализа.

Особый интерес представляют sHASEGP, происходящие из млекопитающих, включая человека. Специалистам в данной области понятно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в существенно неважных частях полипептида не влияют заметным образом на биологическую активность (см., например, Watson et al. //«Molecular Biology of the Gene». 4-е изд. The Benjamin/Cummings Pub. Co. 1987, p. 224).

Термин «заякоренный в мембране HASEGP», как он использован в настоящей работе, относится к семейству заякоренных в мембране гиалуронидаз, имеющих общие структурные особенности, как описано в настоящей работе.

Термин «растворимая гиалуронидаза», как он использован в настоящей работе, относится к полипептиду, для которого характерна растворимость при физиологических условиях. Растворимый HASEGP можно отличить, например, по его переходу в водную фазу раствора тритона X-114, нагретого до 37°C (Bordier et al. //J.Biol.Chem. 1981, v. 256, № 4, p. 1604-1607). С другой стороны, заякоренный в липиде HASEGP будет переходить в богатую детергентом фазу, но будет переходить в обеднённую детергентом или водную фазу после обработки фосфолипазой C.

Таким образом, ссылка, например, на «sHASEGP» охватывает все гликопротеины, кодируемые семейством генов sHASEGP, включая (но не ограничиваясь ими) sHASEGP человека, sHASEGP мыши, или эквивалентную молекулу, полученную из любого другого источника, или молекулу, приготовленную синтетически, или молекулу, обладающую такой же активностью. Последовательности кодирующих молекул нуклеиновой кислоты и кодируемые аминокислотные последовательности приводимых для примера sHASEGP и/или их доменов, приведены далее, например, в последовательности SEQ ID NO: 4. Этот термин охватывает также sHASEGP с аминокислотными заменами, которые не меняют существенно активность каждого представителя, и охватывают также их варианты, полученные сплайсингом. Подходя-

щие замещения, включающие, но не обязательно, консервативные замещения аминокислот, известны специалистам в данной области и могут быть сделаны без утраты биологической активности, такой как каталитическая активность, получаемой молекулы.

Термин «sHASEGP», как он использован в настоящей работе, при всякой ссылке на него, включает по меньшей мере один или все, или любую комбинацию из следующих:

полипептид, кодируемый последовательностью нуклеотидов, приведённую далее как последовательность SEQ ID NO: 6, или последовательностью нуклеотидов, включающей нуклеотиды, которые кодируют аминокислоты 1-509 в последовательности SEQ ID NO: 1;

полипептид, кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая гибридизируется при условиях низкой, умеренной или высокой степени строгости с последовательностью нуклеотидов, приведённой далее как последовательность SEQ ID NO: 6;

полипептид, который включает последовательность аминокислот, приведённую далее как аминокислоты 1-509 в последовательности SEQ ID NO: 1;

полипептид, который включает последовательность аминокислот, имеющую степень идентичности по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с последовательностью аминокислот, приведённой далее как последовательность SEQ ID NO: 1 или как аминокислоты 1-448 в последовательности SEQ ID NO: 4.

В частности, предусматривается полипептид sHASEGP с гиалуронидазными доменами, как указано в последовательности SEQ ID NO: 4. Полипептид представляет собой одноцепочечный или двухцепочечный полипептид. Предусматриваются также его меньшие части, которые сохраняют гиалуронидазную активность. Гиалуронидазные домены из sHASEGP различаются по размеру и составу, в том числе имеют вставки и делеции в поверхностных петлях. Таким образом, для указанных здесь целей каталитический домен представляет собой часть sHASEGP, как определено в настоящей работе, и гомологичен домену других гиалуронидазоподобных последовательностей, таких как HYAL1, HYAL2, HYAL3, которые были идентифицированы ранее. Ранее, однако, не было отмечено, что изолированная одноцепочечная форма гиалуронидазного домена человека может функционировать в испытаниях in vitro. В консервативных лейтмотивах присутствуют остатки аспартата и глутамата, необходимые для активности.

Термин «нейтральный гиалуронидазный домен растворимого sHASEGP» относится к бета-1,4-эндоглюкозаминидазному домену sHASEGP, который проявляет гиалуронидазную активность при нейтральном pH, растворим при описанных условиях и имеет одинаковые гомологию и структурные особенности с доменами гиалуронидазного семейства гликозил-гидролаз, но содержит дополнительные последовательности в карбоксильном конце, необходимые для активности в нейтральных условиях. Следовательно, он представляет собой по меньшей мере минимальную часть домена, которая проявляет гиалуронидазную активность при испытаниях стандартными методами анализа in vitro, и остаётся растворимым. В настоящей работе рассматриваются такие гиалуронидазные домены и их каталитически активные части. Предусматриваются также усечённые формы гиалуронидазного домена, включающие его наименьший фрагмент, действующий каталитически в виде одноцепочечной формы.

Гиалуронидазный домен sHASEGP во всех случаях, когда на него сделана ссылка, включает по меньшей мере один, или все, или любую комбинацию, или каталитически активную часть из следующего:

гликопротеиновый полипептид с N-связью, который включает последовательность аминокислот, приведённую далее как последовательность SEQ ID NO: 1;

полипептид, кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая гибридизируется при условиях низкой, умеренной или высокой степени строгости с последовательностью нуклеотидов, приведённой далее как последовательность SEQ ID NO: 6;

полипептид, который включает последовательность аминокислот, приведённую далее как последовательность SEQ ID NO: 1;

полипептид, который включает последовательность аминокислот, имеющую степень идентичности по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с последовательностью аминокислот, приведённой далее как последовательность SEQ ID NO: 1; и/или

гиалуронидазный домен полипептида, кодируемого полученным сплайсингом вариантом sHASEGP.

Таким образом, для указанных в настоящей работе задач гиалуронидазный домен представляет собой часть sHASEGP, как он определён в настоящей работе, и гомологичен домену других sHASEGP. Так же, как и для более обширного класса ферментов гиалуронидазного семейства, каталитические домены sHASEGP имеют высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей. В консервативных лейтмотивах присутствуют остатки Asp и Glu, необходимые для активности.

Под активной формой подразумевается форма, активная in vivo и/или in vitro. Как описано в настоящей работе, гиалуронидазный домен может также существовать как растворимый секретируемый гликопротеин. В настоящей работе показано, что, по меньшей мере, in vitro одноцепочечные формы sHASEGP и его каталитические домены или ферментативно активные части (как правило, С-концевые усечения) обладают гиалуронидазной активностью. Поэтому в настоящей работе предлагаются изолированные формы гиалуронидазных доменов sHASEGP и способы их применения в анализах на скрининг

лекарств in vitro для идентификации агентов, модулирующих их активность.

Термин «каталитически активный домен sHASEGP», как он использован в настоящей работе, относится к активному в нейтральных условиях эндоглюкозаминидазному домену, как это определено по активности in vitro no отношению к гликозаминогликановому субстрату.

Представляющие интерес sHASEGP включают такие sHASEGP, которые активны по отношению к хондроитин-сульфатам и хондроитин-сульфат-протеогликанам (CSPGs) in vivo и in vitro; и такие, которые активны по отношению к гиалуронану. Термин «sHASEGP человека» представляет собой sHASEGP, кодируемый нуклеиновой кислотой, такой как ДНК, присутствующей в геноме человека, включая все аллельные варианты и консервативные вариации, если только они не являются вариантами, обнаруживаемыми у других млекопитающих.

Термин «нуклеиновая кислота, кодирующая гиалуронидазный домен или каталитически активную часть sHASEGP», как он использован в настоящей работе, следует понимать как относящийся к нуклеиновой кислоте, кодирующей лишь перечисленные одноцепочечный гиалуронидазный домен или его активную часть, но не другие смежные части sHASEGP как непрерывную последовательность.

Термины «заболевание» или «расстройство», как они использованы в настоящей работе, относятся к патологическому состоянию организма, являющемуся результатом, например, инфекции или генетического дефекта, и характеризуемому годными для идентификации симптомами.

Термин «сплайсинговый вариант» или «полученный сплайсингом вариант», как он использован в настоящей работе, относится к варианту, полученному характерной обработкой (процессингом) исходного транскрипта геномной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, приводящей к получению более чем одного типа мРНК. В настоящей работе предусматриваются сплайсинговые варианты sHASEGP.

Термин «гиалуронидазный домен белка sHASEGP», как он использован в настоящей работе, относится к гиалуронидазному домену sHASEGP, обладающему эндоглюкозаминидазной активностью в нейтральных условиях. Следовательно, он представляет собой, по меньшей мере, минимальную часть белка, которая проявляет эндоглюкозаминидазную активность при испытаниях стандартными способами анализа in vitro. Приводимые для примера гиалуронидазные домены человека включают для проявления эндоглюкозпаминидазной активности, по меньшей мере, достаточную часть последовательностей аминокислот, приведённых далее как последовательность SEQ ID NO: 4.

Рассматриваются также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид, имеющийт эндоглюкозаминидазную активность при анализе активности гиалуронидазы in vitro и степень идентичности последовательности по меньшей мере 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с гиалуронидазным доменом полной длины полипептида sHASEGP, или которые гибридизируются по всей своей длине или по меньшей мере 70, 80 или 90% от полной длины с нуклеиновыми кислотами, кодирующими гиалуронидазный домен, в особенности при условиях умеренной, обычно высокой, степени строгости.

Для гиалуронидазных доменов остатки в N-концевой части могут быть крайне важными, но недостаточными для активности. В настоящей работе показано, что гиалуронидазный домен sHASEGP каталитически активен. Следовательно, для активности гиалуронидазного домена нужны, как правило, его N-концевые аминокислоты; С-концевая часть может быть усечена вплоть до последнего остатка цистеина, но домену для оптимальной активности нужны дополнительные аминокислоты. Количество аминокислот, которые могут быть удалены, можно определить эмпирически тестированием гиалуронидазной активности полипептида анализом in vitro, который определяет степень каталитического расщепления.

Поэтому рассматриваются меньшие части гиалуронидазных доменов, в частности их одноцепочечные домены, сохраняющие гиалуронидазную активность. Такие уменьшенные версии представляют собой, как правило, усечённые на С-конце версии гиалуронидазных доменов. Гиалуронидазные домены различаются по размеру и составу, в том числе имеют вставки и делеции в поверхностных петлях. Такие домены проявляют консервативные особенности структуры, включая по меньшей мере одну структурную особенность, такую как донор протона, и/или другие особенности гиалуронидазных доменов эндоглюкозаминидаз. Так, для обозначенных в настоящей работе задач гиалуронидазный домен представляет собой одноцепочечную часть sHASEGP, как он определён в настоящей работе, но он гомологичен по своим структурным особенностям и по сохраняющимся последовательностям, определяющим подобие или гомологию гиалуронидазного домена, другим гиалуронидазо-подобным последовательностям. Гликопротеин проявляет гиалуронидазную активность как одиночная цепь.

Под гомологией, как этот термин используется в настоящей работе, подразумевается степень идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты большая, чем 25%, такая как 25, 40, 60, 70, 80, 90, или 95%. При необходимости процент гомологии может быть точно установлен. Термины «гомология» и «идентичность» часто используются как взаимозаменяемые. Как правило, последовательности выравнивают таким образом, что получается перекрывание наибольшего порядка (см., например: "Computational Molecular Biology". Под ред. Lesk A.M. Oxford University Press, New York, 1988; "Biocomputing: Informatics and Genome Projects". Под ред. Smith D.W. Academic Press, New York, 1993; "Computer Analysis of Sequence Data", Part 1. Под ред. Griffin A.M. and Griffin H.G. Humana Press, New Jersey, 1994; "Sequence Analysis in Molecular Biology". Под ред. von Heinje G. Academic Press, 1987; "Sequence Analysis Primer".

Под ред. Gribskov M. and Devereux J. M. Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. //Siam J. Applied Math. 1988, v. 48, p. 1073).

При установлении идентичности последовательностей определяют число сохраняющихся (консервативных) аминокислот с помощью стандартных программ с алгоритмами выравнивания, которые используются с устанавливаемыми каждым поставщиком программ вычетами несовпадающих пробелов. Существенно гомологичные молекулы нуклеиновых кислот гибридизируются, как правило, при условиях умеренной или высокой степени строгости по всей длине нуклеиновой кислоты или по длине, составляющей по меньшей мере примерно 70, 80 или 90% от полной длины представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты. Рассматриваются также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие вырожденные кодоны вместо кодонов в гибридизирующейся молекуле нуклеиновой кислоты.

Можно определить, имеют ли две молекулы нуклеиновой кислоты нуклеотидные последовательности, которые «идентичны» по меньшей мере, например, на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, или 99% с помощью известных компьютерных алгоритмов, таких как программа "FASTA", использующая, например, параметры вычетов, как предложено Pearson et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, v. 85, p. 2444. Другие программы включают пакет программ GCG (Devereux J. et al. //Nucleic Acids Research. 1984, v. 12, p. 387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul S.F. //J. Molec. Biol. 1990, v. 215, p. 403; "Guide to Huge Computers". Под ред. Martin J. Bishop. Academic Press, San Diego, 1994; и Carillo et al. //Siam J. Applied Math. 1988, v. 48, p. 1073). Например, для определения идентичности можно использовать функцию BLAST банка данных от National Center for Biotechnology Information. Другие коммерчески поставляемые или открытые программы включают программу DNASTAR "MEGALIGN" PROGRAM (Madison, WI) и программу "Gap" группы University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWD) (Madison, WI). Процент гомологии или идентичности белков и/или молекул нуклеиновой кислоты можно определить, например, с помощью компьютерной программы GAP (см., например, Needleman et al. //J. Mol. Biol. 1970, v. 48, p. 443; ссылка в обзоре Smith and Waterman //Adv. Appl. Math. 1981, v. 2, p. 482). Вкратце, программа GAP определяет степень подобия как число расположенных последовательно символов (т.е. нуклеотидов или аминокислот), являющихся одинаковыми, делённое на общее число символов в более короткой из двух последовательностей.

Параметры вычета для программы GAP могут включать:

1) однокомпонентную (одномерную) матрицу сравнения (содержащую значение 1 для идентичностей и 0 для неидентичностей) и нормированную матрицу сравнения по Gribskov et al. //Nucl. Acids. Res. 1986, v. 14, p. 6745, описанную в "Atlas of Protein Sequence and Structure". Под ред. Schwartz and Dayhoff. National Biomedical Research Foundation, 1979, p. 353-358;

2) вычет 3,0 для каждого пробела и дополнительный вычет 0,10 для каждого символа в каждом пробеле;

3) отсутствие вычетов для концевых пробелов.

Следовательно, термин «идентичность», как он использован в настоящей работе, представляет сравнение между испытуемым и референсным полипептидами или полинуклеотидами.

Термин «не менее чем на 90% идентичен с», как он использован в настоящей работе, относится к проценту идентичности от 90 до 99,99% по отношению к референсным полипептидам. Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, предполагая для примера, что сравниваются испытуемый и референсный полипептиды длиной 100 аминокислот; при этом не более 10% (т.е. 10 из 100) аминокислот в испытуемом полипептиде отличаются от аминокислот в референсном полипептиде. Подобные же сравнения могут быть произведены между испытуемым и референсным полинуклеотидами. Такие различия могут быть представлены точечными мутациями, случайным образом распределёнными по всей длине аминокислотной последовательности, или же они могут быть расположены блоками различной длины в одной или нескольких позициях, составляя максимально допустимую разницу в аминокислотах 10/100 (идентичность приблизительно 90%). Различия определены как замещения или делеции в последовательности нуклеиновой кислоты или в последовательности аминокислот. При уровне гомологии или идентичности выше, чем приблизительно 85-90% результат не должен зависеть от программы и установки параметров пробелов; такие высокие уровни идентичности могут быть легко обнаружены, часто без обращения к компьютерным программам.

Термин «праймер», как он использован в настоящей работе, относится к олигонуклеотиду, содержащему два или более дезоксирибонуклеотида или рибонуклеотида, обычно более трёх, которые могут инициировать синтез продукта удлинения праймера. Экспериментальные условия, благоприятные для синтеза, включают наличие нуклеозид-трифосфатов и агента для полимеризации и удлинения, такого как ДНК-полимераза, а также подходящие буфер, температуру и pH.

Упоминаемые в настоящей работе животные включают любых животных, таких как (но не ограничиваясь ими) козы, коровы, олени, овцы, грызуны, свиньи и люди. Животные, не являющиеся людьми (non-human animals) не включают человека как рассматриваемое животное. Предусматриваемые в настоящей работе sHASEGP происходят из любого источника: животного, растительного, прокариотического и грибкового. Большинство sHASEGP происходят из животных, включая млекопитающих.

Термин «генетическая терапия (генная терапия)», как он использован в настоящей работе, включает перенос гетерологичной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, в определённые клетки, клетки-мишени из млекопитающего, особенно человека, имеющего расстройство или болезненное состояние, для которого подбирается такая терапия. Нуклеиновую кислоту, такую как ДНК, вводят в выбранные клетки-мишени таким способом, что гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, экспрессируется и в результате этого продуцируется кодируемый ею терапевтический продукт.

В качестве альтернативы гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, может некоторым способом опосредовать экспрессию ДНК, кодирующей терапевтический продукт, или она может кодировать продукт, такой как пептид или РНК, который некоторым способом опосредует, прямо или косвенно, экспрессию терапевтического продукта. Генетическая терапия может быть также использована для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт гена, которая заменяет дефектный ген или дополняет продукт гена, продуцируемый животным или клеткой, в который она вводится. Вводимая нуклеиновая кислота может кодировать терапевтический продукт, такой как фактор роста или его ингибитор либо фактор некроза опухолей или его ингибитор, такой как его рецептор, который в норме не продуцируется в животном-хозяине или который не продуцируется в терапевтически эффективных количествах или в терапевтически необходимое время. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки поражённого хозяина, чтобы усилить или иным образом изменить продукт или его экспрессию. Генетическая терапия может также включать доставку ингибитора или репрессора или иного модулятора экспрессии гена.

Термин «гетерологичная нуклеиновая кислота», как он использован в настоящей работе, обозначает нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК и белки, которые не продуцируются в нормальных условиях in vivo клеткой, или которая опосредует или кодирует медиаторы, изменяющие экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, путём воздействия на транскрипцию, трансляцию или другие подвергающиеся регуляции биохимические процессы. Гетерологичной нуклеиновой кислотой, такой как ДНК, может считаться также чужеродная нуклеиновая кислота, такая как ДНК. Любая нуклеиновая кислота, такая как ДНК, которую специалист в данной области может признавать или рассматривать как гетерологичную или чужеродную для клетки, в которой осуществляется экспрессия, входит здесь в понятие «гетерологичная нуклеиновая кислота»; гетерологичная нуклеиновая кислота включает добавляемую извне нуклеиновую кислоту, которая экспрессируется также и эндогенно. Примеры гетерологичной нуклеиновой кислоты включают (но не ограничиваются ими) нуклеиновую кислоту, которая кодирует прослеживаемые маркерные белки, такие как белок, привносящий лекарственную устойчивость, нуклеиновую кислоту, которая кодирует терапевтически эффективные вещества, такие как противораковые агенты, ферменты и гормоны, и нуклеиновую кислоту, такую как ДНК, которая кодирует другие типы белков, такие как антитела. Антитела, кодируемые гетерологичной нуклеиновой кислотой, могут секретироваться или экспрессироваться на поверхности клетки, в которую была введена гетерологичная нуклеиновая кислота.

Гетерологичная нуклеиновая кислота, как правило, не является эндогенной для клетки, в которую она вводится, но получена из другой клетки или приготовлена синтетически.

Как правило, хотя и не обязательно, такая нуклеиновая кислота кодирует РНК и белки, которые в нормальных условиях не продуцируются клеткой, в которой она экспрессируется.

Термин «терапевтически эффективный продукт», как он использован в настоящей работе, обозначает продукт, кодируемый гетерологичной нуклеиновой кислотой, как правило, ДНК, которая, будучи введена в хозяина, экспрессирует продукт, ослабляющий или сводящий на нет симптомы, проявления наследственного или приобретённого заболевания или излечивающий заболевание.

Используемое в настоящей работе утверждение, что гликопротеин состоит, по существу, из гиалуронидазного домена, означает, что единственная часть sHASEGP полипептида представляет собой гиалуронидазный домен или его каталитически активную часть. Полипептид может по желанию включать, и, как правило, включает дополнительные, не входящие в sHASEGP, последовательности аминокислот.

Термин «домен», как он использован в настоящей работе, относится к части молекулы, например, гликопротеина или кодирующей нуклеиновой кислоты, которая структурно и/или функционально отличается от других частей молекулы.

Термин «гиалуронидаза», как он использован в настоящей работе, относится к ферменту, катализирующему гидролиз гликозаминогликанов.

Для ясности ссылка на гиалуронидазу относится ко всем формам и конкретные формы будут специально обозначаться. Для изложенных в настоящей работе задач гиалуронидазный домен включает связанные с мембраной и растворимые формы белка sHASEGP.

Упоминаемые в настоящей работе нуклеиновые кислоты включают ДНК, РНК и их аналоги, включая пептидонуклеиновые кислоты (ПНК) и их смеси. Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми или двунитевыми. Когда упоминаются зонды или праймеры, по усмотрению несущие распознаваемую метку, такую как флуоресцентная или радиоактивная метка, рассматриваются однонитевые молекулы. Такие молекулы обычно имеют такую длину, что их мишень статистически уникальна или существует в малом числе копий (обычно менее 5, как правило, менее 3) для зондирования или амплификации опреде-

лённых последовательностей в библиотеке генов. Как правило, зонд или праймер содержат по меньшей мере 14, 16 или 30 смежных элементов последовательности, комплементарной или идентичной последовательности в рассматриваемом гене. Зонды и праймеры могут быть длиной 10, 20, 30, 50, 100 или более нуклеотидов.

Термин «нуклеиновая кислота, кодирующая фрагмент или часть sHASEGP», как он использован в настоящей работе, относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей только упоминаемый фрагмент или упоминаемую часть sHASEGP, но не другие части sHASEGP.

Термин «функциональное (operative) присоединение» гетерологичной нуклеиновой кислоты к регуляторным и эффекторным нуклеотидным последовательностям, таким как промоторы, энхансеры, сайты остановки транскрипции и трансляции и другие сигнальные последовательности, относится к взаимоотношениям между такой нуклеиновой кислотой, такой как ДНК, и такими последовательностями нуклеотидов. Например, функциональное присоединение гетерологичной ДНК к промотору относится к физической взаимосвязи между ДНК и промотором, в результате чего с промотора инициируется транскрипция такой ДНК РНК-полимеразой, которая специфически распознаёт, связывается и транскрибирует ДНК в рамке считывания. Поэтому выражения «функционально присоединённая» или «функционально ассоциированная» относится к функциональным взаимоотношениям нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, с регуляторными и эффекторными последовательностями нуклеотидов, такими как промоторы, энхансеры, сайты остановки транскрипции и трансляции и другие сигнальные последовательности. Например, функциональное присоединение ДНК к промотору относится к физической и функциональной взаимосвязи между ДНК и промотором, в результате чего транскрипция такой ДНК инициируется с промотора РНК-полимеразой, которая специфически распознаёт, связывается и транскрибирует ДНК. Для того чтобы оптимизировать экспрессию и/или транскрипцию in vitro, может оказаться необходимым удалить, добавить или изменить 5'-нетранслируемые области (5' UTR) в клонах, чтобы удалить избыточные, потенциально неподходящие альтернативные кодоны инициации трансляции (т.е. стартовые кодоны) или иные последовательности, которые могут мешать экспрессии или снижать её на уровне либо транскрипции, либо трансляции. В качестве альтернативы непосредственно в 5'-положении относительно стартового кодона можно ввести консенсусные сайты связывания с рибосомой (см., например, Kozak //J. Biol. Chem. 1991, v. 266, p. 19867-19870), которые могут усилить экспрессию. Желательность (или необходимость) такой модификации может быть установлена опытным путём.

Упоминаемая в настоящей работе последовательность, комплементарная по меньшей мере части РНК, с упоминанием антисмысловых олигонуклеотидов, означает последовательность, чья комплементарность достаточна, чтобы быть способной гибридизироваться с РНК, в основном при условиях умеренной или высокой степени строгости, образуя стабильный дуплекс; в случае двунитевых антисмысловых нуклеиновых кислот sHASEGP можно поэтому тестировать одну нить дуплекса РНК (или двунитевой РНК, dsRNA), или же можно анализировать образование триплекса. Способность гибридизироваться зависит от степени комплементарности и длины антисмысловой нуклеиновой кислоты. Как правило, чем длиннее гибридизирующаяся нуклеиновая кислота, тем больше она может содержать нарушений комплементарного спаривания оснований (base mismatches) с кодируемой РНК sHASEGP, но всё ещё может образовывать стабильный дуплекс (или, как в ряде случаев, триплекс). Специалист в данной области может установить допустимую степень неспаренности оснований с помощью стандартных процедур определения точки плавления гибридного комплекса.

Для обозначенных в настоящей работе задач в любом из sHASEGP и их гиалуронидазных доменов могут быть сделаны аминокислотные замены, при условии, что получаемый в итоге белок проявляет гиалуронидазную активность. Рассматриваемые аминокислотные замещения включают консервативные замещения, такие как представленные далее в табл. 1, которые не нарушают протеолитическую активность. Как описывается в настоящей работе, рассматриваются также замещения, которые изменяют свойства белков, такие как удаление сайтов расщепления и других подобных сайтов. Такие замещения, как правило, не являются консервативными, но они могут быть легко произведены специалистами в данной области.

Специалистам в данной области подходящие консервативные замещения аминокислот хорошо известны и могут быть произведены, как правило, без изменения у получаемой молекулы биологической активности, например ферментативной активности. Специалистам в данной области понятно, что, как правило, одиночные аминокислотные замещения в несущественных участках полипептида, по существу, не меняют биологическую активность (см., например: Watson et al. "Molecular Biology of the Gene", 4-е изд. The Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987, p. 224). В пределы этого определения включён также каталитически активный фрагмент sHASEGP, в особенности одноцепочечная гиалуронидазная часть. Консервативные аминокислотные замещения выполнены, например, в соответствии с замещениями, представленными далее в табл. 1.

Таблица 1

Исходный аминокислотный остаток - консервативное замещение

Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R) Lys, Orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gln (Q) Asn Glu (E) Asp Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gln Ile (I) Leu; Val; Met; Nle; Nva Leu (L); Val; Met; Nle; Nva Lys (K) Arg; Gln; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile; Nle Val Orn 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; Nva.

Допустимы также другие замещения, которые могут быть определены эмпирически или установлены по соответствию с известными консервативными замещениями.

Использованная в настоящей работе аббревиатура Abu обозначает 2-аминомасляную кислоту (2-aminobutyric acid); Orn - это орнитин. Указанные в настоящей работе аминокислоты, которые появляются в различных приводимых аминокислотных последовательностях, идентифицированы в соответствии с их хорошо известными трёхбуквенными или однобуквенными аббревиатурами. Нуклеотиды, появляющиеся в различных фрагментах ДНК, даны в стандартных однобуквенных обозначениях, постоянно используемых в данной области.

Приводимые в настоящей работе зонды или праймеры, основанные на раскрываемых в настоящей работе нуклеотидных последовательностях, содержат последовательности по меньшей мере из 10, 14, обычно по меньшей мере из 16 соприкасающихся нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 6, а зонды - по меньшей мере из 30, 50 или 100 соприкасающихся нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 6. Длина зонда или праймера, обеспечивающая уникальную гибридизацию, является функцией сложности представляющего интерес генома.

Упоминаемое в настоящей работе ослабление симптомов конкретного расстройства введением конкретной фармацевтической композиции относится к любому уменьшению: постоянному или временному, длящемуся или преходящему, которое может быть приписано введению или связано с введением композиции.

Термин «антисмысловые полинуклеотиды», как он использован в настоящей работе, относится к синтетическим последовательностям нуклеотидных гетероциклических оснований, комплементарным мРНК или смысловой нити двунитевой ДНК. Смесь смысловых и антисмысловых полинуклеотидов при подходящих условиях приводит к связыванию двух молекул, или гибридизации. Если эти полинуклеотиды связываются (гибридизируются) с мРНК, происходит ингибирование синтеза белка (трансляции). Если эти полинуклеотиды связываются с двунитевой ДНК, происходит ингибирование синтеза РНК (транскрипции).

Получаемое в результате ингибирование трансляции и/или транскрипции ведёт к ингибированию синтеза белка, кодируемого смысловой нитью. Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты обычно содержит достаточное число нуклеотидов, чтобы специфически связаться с целевой нуклеиновой кислотой; обычно это по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов, часто по меньшей мере 14 или 16, или 30 смежных нуклеотидов или модифицированных нуклеотидов, комплементарных кодирующей части молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует целевой ген, например нуклеиновой кислоты, которая кодирует одноцепочечный гиалуронидазный домен sHASEGP.

Термин «сетка, матрица (array)», как он использован в настоящей работе, относится к набору элементов, таких как антитела, содержащему три или более элемента. Матица с адресованием - это такая матрица, в которой элементы могут быть идентифицированы, обычно по положению на твердофазной подложке. Поэтому элементы матрицы, как правило, иммобилизованы на дискретных доступных для идентификации участках на поверхности твёрдой фазы.

Термин «антитело», как он использован в настоящей работе, относится к иммуноглобулину, либо природному, либо полученному частично или полностью синтетическим путём, включая любое его производное, которое сохраняет специфическую способность антитела к связыванию. Поэтому антитело включает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный или существенно гомологичный домену связывания иммуноглобулина. Антитела включают представителей любых иммуноглобулиновых семейств, в том числе IgG, IgM, IgA, IgD и IgE.

Термин «фрагмент антитела», как он использован в настоящей работе, относится к любому производному антитела, которое меньше его полной длины, сохраняющему по меньшей мере часть специфической способности к связыванию антитела полной длины. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваются ими) фрагменты Fab, Fab', $F(ab)_2$, одноцепочечный Fvs (scFV), Fv, двойное антитело (diabody) dsFv и фрагменты Fd. Фрагмент может включать несколько цепей, соединённых вместе, например, дисульфидными мостиками. Фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и обычно по меньшей мере 200 аминокислот.

Упоминаемый в настоящей работе фрагмент антитела Fv состоит из одного варьируемого тяжёлого домена (VH) и одного варьируемого лёгкого домена, соединённых нековалентными взаимодействиями.

Упоминаемый в настоящей работе dsFv относится к Fv со сконструированной межмолекулярной дисульфидной связью.

Упоминаемый в настоящей работе фрагмент $F(ab)_2$ - это фрагмент антитела, полученный в результате расщепления иммуноглобулина пепсином при pH 4,0-4,5; он может быть экспрессирован с помощью генно-инженерных способов, чтобы получить эквивалентный фрагмент.

Упоминаемые в настоящей работе фрагменты Fab - это фрагменты антитела, получаемые путём расщепления иммуноглобулина папаином; они могут быть экспрессированы с помощью генно-инженерных способов, чтобы получить эквивалентный фрагмент.

Используемое в настоящей работе обозначение scFv относится к фрагментам антитела, содержащим варьируемую лёгкую цепь V и варьируемую тяжёлую цепь (VH), ковалентно соединённые полипептидным мостиком в любой последовательности. Мостик имеет такую длину, чтобы два варьируемых домена были соединены, не мешая друг другу. Мостики включают последовательности n остатков (Gly-Ser) с некоторым количеством распределённых среди них остатков Glu или Lys для повышения растворимости.

Термин «очеловеченные антитела» («humanized antibodies»), как он использован в настоящей работе, относится к антителам, которые модифицированы включением свойственных человеку последовательностей аминокислот, так что их введение человеку не провоцирует иммунного ответа. Способы приготовления таких антител известны. Например, чтобы получить такие антитела, гибридому или другую прокариотическую или эукариотическую клетку, такую как клетку E. coli или CHO, которая экспрессирует моноклональные антитела, изменяют с помощью техники рекомбинантной ДНК таким образом, чтобы она экспрессировала антитела, в которых аминокислотный состав неварьируемой части основан на составе антител человека. Для идентификации таких участков были разработаны компьютерные программы.

Упоминаемые в настоящей работе двойные антитела (diabodies) - это димерные scFv; двойные антитела обычно имеют более короткие пептидные мостики, чем scFv, и они, как правило, димеризуются.

Термин «продукция рекомбинантным способом», как он использован в настоящей работе, значит «с помощью методов рекомбинантной ДНК», что означает применение хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессирования белков, кодируемых клонированной ДНК.

Подразумевается, что термин «определение» (assessing) включает качественное и количественное определение в смысле получения абсолютной величины для активности sHASEGP или его домена, присутствующего в образце, а также получения показателя, соотношения, процентной доли, визуальной или другой величины, указывающей на уровень активности. Определение может быть прямым или косвенным, и реально обнаруживаемое химическое вещество, конечно, не должно быть обязательно самим продуктом протеолиза, но может быть, например, его производным или некоторым дальнейшим веществом.

Термин «биологическая активность» как он использован в настоящей работе, относится к активностям соединения in vivo или к физиологическим проявлениям, являющимся следствием введения in vivo соединения, композиции или иной смеси. Таким образом, биологическая активность касается терапевтических воздействий и фармацевтической активности таких соединений, композиций и смесей. Виды биологической активности могут быть наблюдаемы в системах in vitro, разработанных для тестирования или использования таких видов активности. Так, для очерченных в настоящей работе задач биологической активностью люциферазы является её оксигеназная активность, вследствие которой при окислении субстрата испускается свет.

Термин «функциональная активность», как он используется в настоящей работе, относится к полипептиду или его части, которые проявляют одну или более активностей, присущих белку полной длины.

Типы функциональной активности включают (но не ограничиваются ими) биологическую активность, каталитическую или ферментативную активность, антигенность (способность связываться с антиполипептидным антителом или конкурировать с полипептидом за связывание с антиполипептидным антителом), иммуногенность, способность образовывать мультимеры, способность специфически связываться с рецептором или лигандом для полипептида.

Термин «конъюгат», как он использован в настоящей работе, относится к предусматриваемым в настоящей работе соединениям, которые включают один или более из sHASEGP, включая sHASEGP, в частности и его одноцепочечные гиалуронидазные домены, и один или более из нацеливающих агентов. Эти конъюгаты включают конъюгаты, продуцируемые рекомбинантными способами в виде слитых белков, получаемые химическими способами, такими как химическое сшивание путём, например, сшивания с сульфгидрильными группами, и получаемые любым другим способом, причём по меньшей мере один sHASEGP или его домен соединён, непосредственно или через мостик(и), с нацеливающим агентом.

Термин «нацеливающий агент (targeting agent)», как он использован в настоящей работе, представляет собой любой фрагмент, такой как белок или его эффективная часть, который обеспечивает специфическое связывание конъюгата с рецептором клеточной поверхности, который может интернализовать (переносить в клетку) конъюгат или его sHASEGP-часть. Нацеливающий агент может быть также таким агентом, который содействует или усиливает, например, аффинное выделение или очистку конъюгата, прикрепление конъюгата к поверхности или обнаружение конъюгата или комплексов, содержащих конъюгат.

Упоминаемый в настоящей работе термин «конъюгат с антителом» относится к конъюгату, в котором нацеливающим агентом является антитело.

Термины «производное» или «аналог» молекулы, как они используются в настоящей работе, относятся к полученной из молекулы её части или к модифицированной версии молекулы.

Термин «эффективное количество соединения» для лечения конкретного заболевания, как он использован в настоящей работе, - это количество, достаточное, чтобы ослабить или некоторым образом уменьшить симптомы, связанные с заболеванием. Такое количество может быть введено в виде разовой дозы или может вводиться курсом, в зависимости от того, в каком случае оно эффективно. Это количество может излечивать заболевание, но обычно оно вводится, чтобы ослабить симптомы заболевания. Для достижения необходимой степени ослабления симптомов может потребоваться повторное введение.

Термин «эквивалентный», как он использован в настоящей работе, если он относится к двум последовательностям нуклеиновых кислот, означает, что рассматриваемые последовательности кодируют одну и ту же последовательность аминокислот или эквивалентные белки. Если понятие «эквивалентный» используется в отношении двух белков или пептидов, это означает, что два белка или пептида имеют, по существу, одну и ту же аминокислотную последовательность только с такими аминокислотными замещениями (такими, но не ограничиваясь ими, как консервативные замещения, такие как приведённые выше в табл. 1), которые не меняют существенно активность или функцию белка или пептида. Если «эквивалентный» относится к свойству, это свойство не обязательно должно присутствовать в той же самой степени (например, два пептида могут проявлять разные скорости в одном и том же типе ферментативной активности), но активности обычно, по существу, одни и те же. «Комплементарный», если это относится к двум нуклеотидным последовательностям, означает, что две последовательности нуклеотидов способны гибридизироваться, обычно с содержанием нарушений спаривания между противолежащими нуклеотидами менее 25, 15, 5 или 0%. При необходимости процент комплементарности может быть точно определён. Обычно две молекулы выбирают таким образом, что они будут гибридизироваться в условиях высокой степени строгости.

Упоминаемый в настоящей работе агент, модулирующий активность белка или экспрессию гена или нуклеиновой кислоты, либо снижает, либо повышает, либо иным образом изменяет активность белка или же некоторым образом регулирует её с повышением или с понижением, или иным образом изменяет экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке.

Термин «ингибитор активности sHASEGP», как он использован в настоящей работе, охватывает любое вещество, которое прекращает или снижает продукцию, посттрансляционную модификацию (модификации), созревание или мембранную локализацию sHASEGP, или любое вещество, мешающее его протеолитической эффективности или снижающее его протеолитическую эффективность, в частности, его одноцепочечной формы в анализах на скрининг in vitro.

Термин «способ лечения или предотвращения опухолевого заболевания», как он использован в настоящей работе, означает, что любой из симптомов, таких как опухоль, её метастазы, васкуляризация опухолей или другие параметры, которыми характеризуется заболевание, уменьшаются, снижаются, предотвращаются, переводятся в состояние ремиссии или поддерживаются в состоянии ремиссии. Он также означает, что признаки опухолевого заболевания и метастазирования могут быть удалены, уменьшены или предотвращены лечением. Неограничивающие примеры признаков включают неконтролируемое разрушение базальной мембраны и проксимального внеклеточного матрикса, миграцию, деление и организацию клеток эндотелия в новые функционирующие капилляры и устойчивость таких функционирующих капилляров.

Термин «фармацевтически приемлемые соли, эфиры или иные производные конъюгатов», как он использован в настоящей работе, включает любые соли, эфиры или производные, которые могут быть легко приготовлены специалистами в данной области с использованием известных способов для такой обработки и получением в итоге соединений, которые могут быть введены животным или людям без существенных токсических воздействий и которые являются фармацевтически активными или представляют собой предшественники лекарств.

Термин «пролекарство» («предшественник лекарства», prodrug), как он использован в настоящей работе, - это соединение, которое при введении in vivo подвергается метаболизму или иным образом превращается в биологически, фармацевтически или терапевтически активную форму соединения. Для того чтобы получить пролекарство, фармацевтически активное соединение модифицируют таким образом, что активный компонент регенерируется в ходе метаболических процессов. Пролекарство может быть предназначено для изменения метаболической стабильности или транспортных характеристик лекарства, чтобы препятствовать побочным эффектам или токсичности, чтобы улучшить вкус лекарства или изменить другие характеристики или свойства лекарства. На основании знания фармакодинамических процессов и метаболизма лекарства in vivo, специалисты в данной области могут (если известно фармацевтически активное соединение) сконструировать предшественники этого соединения (см., например: Nogrady //"Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach". Oxford University Press, New York, 1985, p. 388-392).

Термин «лекарство, идентифицированное предусматриваемыми в настоящей работе способами скрининга», как он использован в настоящей работе, относится к любому соединению, которое является кандидатом для применения в качестве терапевтического или преимущественного соединения (lead compound) для создания терапевтического соединения. Такими веществами могут быть небольшие молекулы, в том числе небольшие органические молекулы, пептиды, пептидоимитаторы, антисмысловые молекулы или двунитевые РНК (dsRNA), такие как RNAi, антитела, фрагменты антител, рекомбинантные антитела и другие соединения, которые могут быть кандидатами в лекарства или преимущественными соединениями.

Термин «пептидоимитатор», как он использован в настоящей работе, обозначает соединение, которое имитирует конформацию и определённые стереохимические особенности биологически активной формы конкретного пептида. Как правило, пептидоимитаторы конструируют, чтобы имитировать определённые желательные свойства соединения, но не повторять нежелательные свойства, такие как гибкость, которая приводит к утрате биологически активной конформации и разрыву связей. Пептидоимитаторы могут быть приготовлены из биологически активных соединений путём замещения биоизостерами определённых групп или связей, которые дают вклад в нежелательные свойства. Биоизостеры (т.е. вещества, имеющие подобную пространственную, стерическую конфигурацию) известны специалистам в данной области. Например, метиленовый биоизостер CH_2S был использован как амидный заместитель в аналогах энкефалина (см., например, Spatola //"Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins". Под ред. Weistein, v. 7. Marcel Dekker, New York, 1983). Морфин, который можно вводить перорально, является пептидоимитатором пептида эндорфина. Для определённых в настоящей работе задач среди пептидоимитаторов включены циклические пептиды.

Термины «промоторная область» или «промоторный элемент», как они использованы в настоящей работе, относятся к сегменту ДНК или РНК, контролирующему транскрипцию ДНК или РНК, к которым он функционально присоединён. Промоторная область включает специфические последовательности, достаточные для распознавания РНК-полимеразой, её связывания и инициации транскрипции.

Эта часть промоторной области называется промотором. Кроме того, промоторная область включает последовательности, модулирующие эту активность РНК-полимеразы в распознавании, связывании и инициации транскрипции. Эти последовательности могут быть действующими в цис-положении или могут участвовать в действии трансфункционирующих факторов. Промоторы, в зависимости от природы регуляции, могут быть конститутивными или регулируемыми. Рассматриваемые для примера промоторы для использования в прокариотах включают промоторы бактериофагов Т7 и Т3.

Термин «рецептор», как он использован в настоящей работе, относится к молекуле, которая имеет сродство (аффинность) к данному лиганду. Рецепторы могут быть существующими в природе или синтетическими молекулами. В данной области рецепторы могут быть также названы антилигандами. Термины «рецептор» и «антилиганд», как они использованы в настоящей работе, являются взаимозаменяемыми. Рецепторы могут использоваться в их неизменённом состоянии или как агрегаты с другими видами. Рецепторы могут быть прикреплены, ковалентно или нековалентно, к связывающему участнику или могут находиться с ним в физическом контакте; это может осуществляться прямо или косвенно - через посредство специфического связывающего вещества или мостика («линкера»). Примеры рецепторов включают (но не ограничиваются ими): антитела, рецепторы клеточной мембраны (рецепторы поверхности и интернализующие рецепторы), моноклональные антитела и антисыворотки, реагирующие со специфическими антигенными детерминантами, такими как находящиеся на вирусах, клетках или других материалах), лекарства, полинуклеотиды, нуклеиновые кислоты, пептиды, факторы, лектины, сахара, полисахариды, клетки, клеточные мембраны и органеллы.

Примеры рецепторов и применений с использованием таких рецепторов включают (но не ограничиваются ими:

a) ферменты: специфические транспортные белки или ферменты, необходимые для выживания микроорганизмов, которые могут служить мишенями для отбора антибиотиков (лигандов);

b) антитела: может быть исследована идентификация лиганд-связывающего сайта на молекуле антитела, которая соединяется с эпитопом представляющего интерес антигена; определение последовательности, имитирующей антигенный эпитоп может привести к разработке вакцин, иммуноген которой основывается на одной или более из таких последовательностей; или привести к разработке связанных с этим диагностических агентов или соединений, полезных в терапевтическом воздействии на такие заболевания, как аутоиммунные заболевания;

c) нуклеиновые кислоты: идентификация сайтов связывания лиганда, такого как белок или РНК;

d) каталитические полипептиды: полимеры, в том числе полипептиды, которые способны запускать химическую реакцию, включая конверсию одного или более реагентов в один или более продуктов; такие полипептиды, как правило, включают сайт связывания, специфичный для по меньшей мере одного реагента или промежуточного соединения в реакции, и функционально активный участок, следующий непосредственно за сайтом связывания, в которых функционально активный участок способен химически модифицировать связанный реагент (см., например, патент США № 5215899);

e) рецепторы гормонов: определение лигандов, связывающихся с высокой степенью сродства с рецептором полезно для разработки терапии с замещением гормонов; например, идентификация лигандов, связывающихся с такими рецепторами, может приводить к разработке лекарств для контроля кровяного давления;

f) рецепторы наркотиков (опиатные рецепторы): установление лигандов, связывающихся с рецепторами наркотиков в мозгу, полезно для разработки заместителей морфина и других родственных лекарств, дающих меньшее привыкание.

Термин «образец», как он использован в настоящей работе, относится ко всему, что содержит подлежащий анализу объект, для которого необходим анализ. Образцом может быть биологический образец, такой как биологическая жидкость или биологическая ткань. Примеры биологических жидкостей включают мочу, кровь, плазму, сыворотку, слюну, семенную жидкость, испражнения, мокроту, спинномозговую жидкость, слёзы, слизь, сперму, околоплодные воды или подобные им. Биологическими тканями являются агрегаты клеток, обычно определённого типа, вместе с их внеклеточным веществом, которые формируют один из структурных материалов структуры человека, животного, растения, бактерии, грибка или вируса, включая соединительные, эпителиальные, мышечные и нервные ткани. Примеры биологических тканей включают также органы, опухоли, лимфатические узлы, артерии и индивидуальные клетки.

Термин «строгость условий гибридизации» при определении процентного содержания неспаренностей оснований, как он использован в настоящей работе, состоит в следующем:

1) Высокая степень строгости: 0,1×SSPE (SSPE - 0,18 M NaCl в фосфатном буфере, pH 7,4), 0,1% SDS (додецилсульфат натрия), 65°C.

2) Средняя степень строгости: 0,2×SSPE, 0,1% SDS, 50°C.

3) Низкая степень строгости: 1,0×SSPE, 0,1% SDS, 50°C.

Специалистам в данной области известно, что этап промывки отбирает стабильные гибриды, и известны также ингредиенты SSPE (см., например, Sambrook, Fritsch E.F., Maniatis T.B. «Molecular Cloning, A Laboratory Manual». Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, v. 3, p. B.13; см. также многочисленные каталоги, описывающие обычно используемые лабораторные растворы).

Далее, специалистам в данной области понятно, что стабильность гибридов определяется температурой плавления (T_m), которая является функцией концентрации ионов натрия и температуры (T_m=81,5°C-16,6+0,41(% G+C)-600/L), так что единственными параметрами в условиях промывки, важными для стабильности гибридов, являются концентрация ионов натрия в SSPE (или SSC) и температура. SSC - «standard saline-citrate solution»: 0,15 M NaCl+0,015 M Na-цитрат, pH 7.

Понятно, что эквивалентные степени строгости могут быть получены при использовании альтернативных буферов, солей и температуры. Только с целью примера, но не ограничения, могут быть приведены следующие процедуры, использующие условия низкой степени строгости (см. также Shilo and Weinberg //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, v. 78, p. 6789-6792): содержащие ДНК фильтры предварительно обрабатывают в течение 6 ч при 40°C раствором, содержащим 35% формамид, 5×SSC, 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ ЭДТА (этилендиамин-тетраацетат), 0,1% ПВП (поливинилпирролидон), 0,1% фиколл, 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) и 500 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося. 10×SSC представляет собой раствор 1,5 М хлорида натрия и 0,15 М цитрата натрия, pH которого доведён до 7.

Гибридизацию проводят в таком же растворе со следующей модификацией: 0,02% ПВП, 0,02% фиколл, 0,2% БСА, 100 мкг/мл ДНК спермы лосося, 10% (масса к объёму) декстран-сульфат и (5-20)×10^6 имп./мин меченого ^{32}P-зонда. Фильтры инкубируют в гибридизационной смеси в течение 18-20 ч при 40°C и затем промывают в течение 1,5 ч при 55°C раствором, содержащим 2×SSC, 25 мМ трис-HCl (pH 7,4), 5 мМ ЭДТА и 0,1% SDS. Промывной раствор заменяют свежим раствором и инкубируют в течение ещё 1,5 ч при 60°C. Фильтры просушивают фильтровальной бумагой и экспонируют с плёнкой для авторадиографии. При необходимости фильтры промывают третий раз при 65-68°C и повторно экспонируют с плёнкой. Другие условия для низкой степени строгости, которые могут быть использованы, хорошо известны в данной области (например, это условия, которые используют при межвидовой гибридизации ДНК).

С целью примера, но не ограничения, могут быть приведены следующие процедуры, использующие условия умеренной (средней) степени строгости. Содержащие ДНК фильтры предварительно выдерживают в течение 6 ч при 55°C в растворе, содержащем 6×SSC, 5×раствор Денхардта, 0,5% SDS и 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося. Гибридизацию проводят в том же растворе, добавляя (5-20)×10^6 имп./мин меченого ^{32}P-зонда. Фильтры инкубируют в гибридизационной смеси в течение 18-20 ч при 55°C и затем промывают дважды в течение 30 мин при 60°C в растворе, содержащем 1×SSC и 0,1% SDS. Фильтры просушивают фильтровальной бумагой и экспонируют с плёнкой для авторадиографии. Другие условия умеренной степени строгости, которые можно использовать, хорошо известны в данной области. Промывание фильтров может производиться при 37°C в течение 1 ч в растворе, содержащем 2×SSC и 0,1% SDS.

С целью примера, но не ограничения, могут быть приведены следующие процедуры, использующие условия высокой степени строгости. Предгибридизацию содержащих ДНК фильтров проводят в течение 8 ч в течение ночи (до следующего дня) при 65°С в буфере, состоящем из 6×SSC, 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 0,02% ПВП, 0,02% фиколла, 0,02% БСА и 500 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося. Фильтры подвергают гибридизации в течение 48 ч при 65°С в предгибридизационной смеси, содержащей 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося и $(5\text{-}20)\times10^6$ имп./мин меченого ^{32}P-зонда. Промывку фильтров проводят при 37°С в течение 1 ч в растворе, содержащем 2×SSC, 0,01% ПВП, 0,01% фиколл и 0,01% БСА. После этого проводится промывка в 0,1×SSC при 50°С в течение 45 мин с последующей авторадиографией. Другие условия высокой степени строгости, которые можно использовать, хорошо известны в данной области.

Термины «по существу, идентичный» или «по существу, гомологичный» или подобные им, как понятно специалистам в данной области, варьируют в зависимости от контекста и обозначают, как правило, по меньшей мере 60 или 70%, предпочтительно по меньшей мере 80 или 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность.

Термин «по существу, идентичный продукту» означает «по существу, подобный» в том смысле, что представляющее интерес свойство в основном не изменено, вследствие чего, по существу, идентичный продукт может быть использован вместо основного продукта.

Термин «по существу, чистый», как он использован в настоящей работе, означает - настолько гомогенный, чтобы быть свободным от легко обнаруживаемых примесей, определяемых стандартными способами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), электрофорез в геле и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которые применяются специалистами в данной области для оценки такой чистоты, или настолько существенно чистый, что дальнейшая очистка не меняет заметным образом физических и химических свойств вещества, таких как ферментативная и биологическая активности. Методы очистки соединений с целью получения, по существу, химически чистых соединений известны специалистам в данной области. По существу, химически чистое соединение может быть, однако, смесью стереоизомеров или изомеров. В таких случаях дополнительная очистка может повысить специфическую активность соединения.

Термин «клетка-мишень», как он использован в настоящей работе, относится к клетке, которая экспрессирует sHASEGP in vivo.

Термин «испытуемое вещество» (или «испытуемое соединение»), как он использован в настоящей работе, относится к химически определённому соединению (например, к органическим молекулам, неорганическим молекулам, органическим/неорганическим молекулам, белкам, пептидам, нуклеиновым кислотам, олигонуклеотидам, липидам, полисахаридам, сахаридам или гибридам этих молекул, таким как гликопротеины и т.д.) или к смесям соединений (к примеру, библиотекам испытуемых соединений, природным экстрактам или культуральным жидкостям и т.д.), чьё действие на sHASEGP, в частности на одноцепочечную форму, содержащую гиалуронидазный домен или достаточную для активности его часть, определяют in vitro таким способом, как предлагаемые в настоящей работе способы анализа.

Такие термины, как «терапевтический агент», «лечебная схема», «радиопротектор» или «хемотерапевтическое средство», как они использованы в настоящей работе, означают традиционные лекарства и способы лекарственного лечения, в том числе вакцины, которые известны специалистам в данной области. Радиотерапевтические агенты хорошо известны в данной области.

Термин «лечение», как он использован в настоящей работе, означает любой образ действий, при котором симптомы болезненного состояния, расстройства или заболевания ослабляются или иным образом благоприятно изменяются.

Лечение также охватывает любое фармацевтическое применение предлагаемых в настоящей работе композиций.

Термин «вектор» (или «плазмида»), как он использован в настоящей работе, относится к дискретным элементам, которые используются для введения в клетки гетерологичной нуклеиновой кислоты для неё экспрессии или репликации. Векторы, как правило, остаются эписомными, но они могут быть сконструированы так, чтобы достигалась интеграция гена или его части в хромосому генома. Рассматриваются также векторы, являющиеся искусственными хромосомами, такими, как дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и искусственные хромосомы млекопитающих (MAC). Селекция и использование таких переносчиков хорошо известны специалистам в данной области. Экспрессирующий вектор включает векторы, способные экспрессировать ДНК, которая функционально соединена с регуляторными последовательностями, такими, как промоторные области, которые способны осуществлять экспрессию таких фрагментов ДНК. Таким образом, экспрессирующий вектор относится к конструкции с рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плазмида, фаг, рекомбинантный вирус или иной вектор, который при введении в подходящую клетку-хозяина приводит к экспрессии клонированной ДНК. Подходящие экспрессирующие векторы хорошо известны специалистам в данной области и включают такие векторы, которые способны реплицироваться в эукариотических клетках и/или в прокариотических клетках, и такие, которые остаются эписомными, или такие, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

Термин «белковая последовательность связывания», как он использован в настоящей работе, относится к последовательности белка или пептида, которая способна специфически связываться с последовательностью другого белка или пептида вообще, с набором последовательностей белков или пептидов или же с конкретной последовательностью белка или пептида.

Термин «эпитопная метка» («epitope tag»), как он использован в настоящей работе, относится к короткой протяжённости аминокислотных остатков, соответствующих эпитопу, предназначенных для облегчения последующего биохимического и иммунологического анализа помеченного в эпитопе белка или пептида. Введение метки в эпитоп достигается путём вставки последовательности для эпитопной метки в кодирующую белок последовательность в соответствующем экспрессирующем векторе. Белки с метками в эпитопе можно подвергнуть аффинной очистке, используя высоко специфичные антитела, нацеленные на метки.

Термин «последовательность связывания с металлом», как он использован в настоящей работе, относится к последовательности белка или пептида, способной специфически связываться вообще с ионами металлов, с набором ионов металлов или с конкретным ионом металла.

Термин «комбинация», как он использован в настоящей работе, относится к любой ассоциации между двумя или более партнёрами.

Термин «композиция», как он использован в настоящей работе, относится к любой смеси. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста - водная или неводная или их любая комбинация.

Термин «жидкость», как он использован в настоящей работе, относится к любой композиции, которая способна течь. Поэтому жидкости охватывают такие композиции, которые находятся в форме полутвёрдых веществ, паст, растворов, водных смесей, гелей, лосьонов, кремов и других подобных композиций.

Термин «клеточный экстракт», как он использован в настоящей работе, относится к препарату или фракции, которые получены из лизированных или разрушенных клеток.

Если говорится, что «средство» (или «агент»), как этот термин используется в настоящей работе, выбрано случайным образом, это означает, что средство выбрано случайным образом без учета специфических последовательностей, участвующих в ассоциации белка самого по себе или с ассоциированными с ним субстратами, связывающимися партнёрами, и т.д. Примером случайным образом выбранных средств является использование химической библиотеки или пептидной комбинаторной библиотеки, или ростовой среды организма, или среды, отвечающей внешним условиям.

Если говорится, что средство выбрано или сконструировано рационально, это означает, что средство выбрано на неслучайной основе, которая принимает во внимание связь между последовательностью адресующего сайта и/или его конформацией и действием средства. Как описано в примерах, существуют предполагаемые сайты связывания для гиалуронидазного и (каталитического) сайтов в гликопротеине, имеющем последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность SEQ ID NO: 4. Средства могут быть рационально выбраны или рационально сконструированы путём использования пептидных последовательностей, которые образуют эти сайты. Например, рационально выбранным пептидным средством может быть пептид, чья аминокислотная последовательность идентична сайтам или доменам связывания ATP или кальмодулина.

Считается, что олигосахариды имеют редуцирующий конец и нередуцирующий конец, вне зависимости от того, является ли сахарид на редуцирующем конце действительно редуцирующим сахаром. В соответствии с принятой номенклатурой, олигосахариды изображены в настоящей работе с нередуцирующим концом слева и редуцирующим концом справа. Все описанные в настоящей работе олигосахариды описаны с названием или аббревиатурой для нередуцирующего сахарида (например, Gal), за которым следует конфигурация гликозидной связи (альфа или бета), связь в кольце, положение в кольце редуцирующего сахарида, участвующего в связи, и затем название или аббревиатура редуцирующего сахарида (например, GlcNAc). Связь между двумя сахарами может быть обозначена, например, как 2, 3, 2→.3 или (2, 3). Каждый сахарид является пиранозой.

Термин «N-связанный сахарный фрагмент», как он использован в настоящей работе, относится к олигосахариду, присоединённому к sHASEGP посредством амидного азота в остатках Asn. N-связанные олигосахариды подразделяются на несколько главных типов (олигоманнозные, комплексные, гибридные, сульфированные), все они имеют сердцевины $(Man)_3$-GlcNAc-GLcNAc-, присоединённые через атом амидного азота в остатках Asn, находящихся в пределах последовательностей -Asn-Xaa-Thr/Ser- (где Xaa - это не Pro). Часто сайты с N-связью косвенно различимы по появлению «пустого» цикла при секвенировании. Позитивная идентификация может быть осуществлена после высвобождения олигосахарида ферментом PNGазой F, которая превращает гликозилированный Asn в Asp. После удаления PGNазы F N-связанные олигосахариды могут быть очищены с помощью хроматографии на биогеле P-6, а олигосахаридный пул подвергается препаративной анионообменной хроматографии при высоком pH (high pH anion exchange chromatography, HPAEC) (Townsend et al. //Anal. Biochem. 1989, v. 182, p. 1-8). С помощью HPAEC можно разделить некоторые изомеры олигосахаридов. На хроматограммах HPAEC остатки фукозы смещаются к более раннему элюированию, тогда как остатки дополнительной сиаловой кислоты выходят при большем времени элюирования. Путём сопутствующей обработки гликопротеинов с известной олигосахаридной структурой (например, фетуин крупного рогатого ско-

та, кислый гликопротеин α-1, овальбумин, РНКаза В, трансферрин) можно улучшить идентификацию олигосахаридных пиков. Собранные олигосахариды можно охарактеризовать сочетанием анализов состава и метилирующих связей (Waeghe et al. //Carbohydr. Res. 1983, v. 123, p.281-304), различая аномерные конфигурации с помощью спектроскопии ЯМР (Van Halbeek //Methods Enzymol. 1993, v. 230).

В качестве альтернативы можно идентифицировать олигосахариды с помощью соединённого с флуоресценцией электрофореза углеводов (fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis, FACE) (см. Callewaert et al. //Glycobiology. 2001, v. 11, p. 275-281).

Термин «сиаловая кислота», как он использован в настоящей работе, относится к любому представителю семейства 9-углеродных карбоксилированных сахаров. Наиболее часто встречающимся представителем семейства сиаловых кислот является N-ацетилнейраминовая кислота (2-кето-5-ацетамидо-3,5-дидезокси-D-глицеро-D-галактононулопираноз-1-ная кислота (обозначение часто сокращается как Neu5Ac, NeuAc или NANA). Вторым представителем семейства является N-гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc или NeuGc), в которой N-ацетильная группа в NeuAc гидроксилирована. Третьим представителем семейства сиаловых кислот является 2-кето-3-дезоксинонулосоновая кислота (KDN) (Nadano et al. //J. Biol. Chem. 1986, v. 261, p. 11550-11557; Kanamori et al. //J. Biol. Chem. 1990, v. 265, p. 21811-21819). Сюда входят также 9-замещённые сиаловые кислоты, такие как подобные соединению 9-O-C.sub.1-C.sub.6 acyl-Neu5Ac-9-O-лактил-Neu5Ac или 9-O-ацетил-Neu5Ac, 9-дезокси-9-фтор-Neu5Ac и 9-азидо-9-дезокси-Neu5Ac. Для обзора семейства сиаловых кислот см., например, Varki //Glycobiology. 1992, v. 2, p. 25-40; "Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function". Под ред. R. Schauer. Springer-Verlag, N. Y., 1992. Синтез и применение соединений с сиаловыми кислотами в процедуре сиалирования раскрыты в международной публикации WO 92/16640, опубликованной 1 октября 1992 г.

Использованное в настоящей работе обозначение «PNGaза» (PNGase) относится к специфичной к аспарагиновому пептиду N-гликозидазе F, такой как пептид-N-гликозидаза F из Flavobacterium maningoseptum. Для ферментов PNGaз характерна специфичность к N-связанным, но не к O-связанным олигосахаридам. Охарактеризовать эффективность PNGазы можно с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS или с помощью электрофореза углеводов в соединении с флуоресценцией.

Упоминаемое в настоящей работе в основном оконечное сиалирование относится к N-связанным олигосахаридам, оканчивающимся остатком сиаловой кислоты в качестве оконечного сахара. Оконечные сиаловые кислоты могут быть идентифицированы с помощью анализа методом FACE углеводов, высвобождаемых после обработки нейраминидазой.

Время жизни гликопротеинов при циркуляции в крови в высокой степени зависит от состава и структуры присоединённых N-связью углеводных групп. Этот факт имеет непосредственное значение для терапевтических гликопротеинов, предназначенных для парентерального введения. Как правило, для максимального времени полужизни в циркуляции гликопротеина необходимо, чтобы его N-связанные углеводные группы оканчивались последовательностью NeuAc-Gal-GlcNAc. Без оконечной сиаловой кислоты (NeuAc) гликопротеин быстро выводится из кровотока с помощью механизма, включающего распознавание прилегающих остатков N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или галактозы (Gal) (Goochee et al. //Biol/Technology. 1991, v. 9, p. 1347-1355). По этой причине для коммерческого производства терапевтических гликопротеинов важным обстоятельством является наличие в их N-связанных углеводных группах оконечной сиаловой кислоты.

Циркулирующие гликопротеины подвергаются действию сиалидазы (сиалидаз) (или нейраминидазы), которые могут отщеплять концевые остатки сиаловой кислоты. Как правило, удаление сиаловой кислоты открывает галактозные остатки, которые распознаются и связываются галактозоспецифичными рецепторами гепатоцитов (обзор см. в Ashwell and Harford //Ann. Rev. Biochem. 1982, v. 51, p. 531). Печень содержит также другие сахароспецифичные рецепторы, которые являются посредниками в выведении гликопротеинов из циркуляции. Эти рецепторы специфичны также к N-ацетилглюкозамину, маннозе, фукозе и фосфоманнозе. Удаляемые с помощью галактозных рецепторов гликопротеины претерпевают существенное расщепление и затем поступают в жёлчь; выводимые с помощью маннозных рецепторов клеток Купфера гликопротеины поступают в ретикулоэндотелиальную систему (обзор см. в Ashwell and Harford //Ann. Rev. Biochem. 1982, v. 51, p. 531).

Термин «активный в нейтральных условиях» (или «нейтрально активный»), как он использован в настоящей работе, относится к гликопротеину sHASEGP с каталитической активностью по отношению к гликозаминогликановому субстрату in vitro при pH в интервале от 5 до 8 при концентрации соли менее чем 150 мМ и буферной силе менее чем 50 мМ.

Термин «стабилизированный раствор», как он использован в настоящей работе, относится к sHASEGP, который сохраняет более 60% своей исходной активности после хранения при комнатной температуре в течение 30 дней.

Термин «единица», как он использован в настоящей работе, если не определён иначе, представляет собой единицу снижения мутности (turbidity reducing unit, TRU). Одна TRU определяется как такая величина гиалуронидазной активности, которая необходима для снижения мутности подкисленного раствора гиалуроновой кислоты и эквивалентна единице NFU Фармакологического справочника фармакопеи США (USP/National Formulary (NF XIII)). Приведенный в настоящей работе иммуноферментный анализ

типа твердофазного иммуноферментного анализа ELISA может быть соотнесён с единицами TRU, NFU или единицей Национальной фармакопеи США (USP) с помощью стандартной кривой для образца гиалуронидазы (например, стандарт Фармакопеи США или Всемирной организации здравоохранения, ВОЗ), стандартизованного по правилам Фармакопеи США. Следовательно, ферментативные активности, определённые иммуноферментным анализом типа ELISA, выражаются на самом деле в относительных единицах TRU, поскольку в турбидиметрическом анализе ферментативная активность в действительности не измеряется (Dorfman et al. //J. Biol. Chem. 1948, v. 172, p. 367).

«Эффективность» (potency), как она указывается в настоящей работе, определяется количеством белка sHASEGP, необходимого для расщепления субстрата in vitro с использованием единицы снижения мутности или относительной единицы снижения мутности.

Термин «удельная активность» (specific activity), как он использован в настоящей работе, относится к единицам активности на 1 мг белка. Количество белка sHASEGP определяют по поглощению раствора sHASEGP при 280 нм, принимая коэффициент молярной экстинкции равным приблизительно 1,7 $M^{-1} \cdot см^{-1}$.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) и ранее широко использовался в биоматериалах, биотехнологии и медицине, прежде всего, потому что это - биологически совместимый, нетоксичный, неиммуногенный и водорастворимый полимер (Zhao and Harris //ACS Symposium Series. 1997, v. 680, p. 458-472). В области доставки лекарств производные ПЭГ широко используются в ковалентном присоединении к белкам (например, «ПЭГилирование») для снижения их иммуногенности, протеолиза и выведения через почки и для повышения растворимости (Zalipsky //Adv. Drug. Del. Rev. 1995, v. 16, p. 157-182). Подобным же образом присоединяли ПЭГ к низкомолекулярным, относительно гидрофобным лекарствам для повышения их растворимости, снижения токсичности и изменения биологического распределения. Как правило, ПЭГилированные лекарства вводят инъекцией в виде растворов.

Тесно связанным применением является синтез сшитых разлагаемых сеток или композиций с ПЭГ для применения в доставке лекарств, поскольку многое из таких же химических подходов, применённых в конструировании разлагаемых, растворимых носителей лекарств, может быть использовано в создании разлагаемых гелей (Sawhney et al. //Macromolecules. 1993, v. 26, p. 581-587). Известно также, что межмолекулярные комплексы можно получать смешиванием растворов двух комплементарных полимеров. Такие комплексы обычно стабилизированы электростатическими взаимодействиями (полианион-поликатион), и/или образованием водородных связей (поликислота-полиоснование) между участвующими полимерами, и/или гидрофобными взаимодействиями между полимерами в водном окружении (Krupers et al. //Eur. Polym. J. 1996, v. 32, p. 785-790). Например, смешивание растворов полиакриловой кислоты (ПАК) и полиэтиленоксида (ПЭО) при подходящих условиях приводит к образованию комплексов, в основном путём формирования водородных связей. Диссоциацию этих комплексов при физиологических условиях использовали для доставки свободных лекарств (например, не ПЭГилированных). Кроме того, комплексы комплементарных полимеров получали из гомополимеров и сополимеров.

В одном из аспектов полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу приблизительно от 3 до приблизительно 50 кДа, предпочтительно приблизительно от 5 до приблизительно 30 кДа. Ковалентное связывание ПЭГ с лекарством (известное как «ПЭГилирование») может быть достигнуто с помощью известных методов химического синтеза. Например, в одном из аспектов настоящего изобретения ПЭГилирование белка может быть произведено путём реакции ПЭГ, активированного NHS, с белком при подходящих условиях реакции.

Хотя для ПЭГилирования было описано много реакций, наиболее широко применимые из них являются прямыми, используют мягкие реакционные условия, и не требуют экстенсивной последующей обработки для удаления токсичных катализаторов или побочных продуктов. Например, монометокси-ПЭГ (мПЭГ) имеет только один реакционно-способный концевой гидроксил, и поэтому его применение частично ограничивает гетерогенность получаемых в смеси продуктов ПЭГ-белок. Обычно для достижения эффективного ПЭГилирования белка необходима активация гидроксильной группы на конце полимера, противоположном концевой метоксигруппе. Это требуется для того, чтобы сделать модифицированный ПЭГ более восприимчивым для нуклеофильной атаки. Атакующим нуклеофилом обычно является эпсилон-аминогруппа лизильного остатка, но при благоприятных локальных условиях и другие амины (например, N-концевой альфа-амин или амины в кольце гистидина) могут давать реакцию. В белках, содержащих одиночный лизин или цистеин, возможно более направленное прикрепление. На остаток цистеина может быть нацелен ПЭГ-малеимид для тиол-специфичной модификации. В качестве альтернативы ПЭГ-гидразид может реагировать с окисленным периодатом sHASEGP и затем быть восстановленным в присутствии $NaCNBH_3$. Более специфично, ПЭГилированные сахара CMP (цитидинмонофосфата, cytidine monophosphate) могут реагировать с sHASEGP в присутствии соответствующих гликозилтрансфераз. Одной из техник является техника «ПЭГилирования», в которой к целевому полипептиду присоединено несколько полимерных молекул. При использовании такой техники у иммунной системы возникают трудности в распознавании ответственных за образование антител эпитопов на поверхности полипептида, что ослабляет иммунную реакцию. Для полипептидов, вводимых непосредственно в циркуляторную систему тела человека с целью получения конкретного физиологического эффекта (т.е. для

фармацевтических препаратов), типичным потенциальным иммунным ответом является появление IgG и/или IgM, тогда как при ингаляции полипептидов в дыхательную систему (например, полипептиды в промышленных загрязнениях) потенциальным ответом может быть появление IgE (т.е. аллергическая реакция). Одна из теорий, объясняющих сниженный иммунный ответ, состоит в том, что полимерная молекула (полимерные молекулы) экранирует (экранируют) эпитоп(ы) на поверхности полипептида, ответственные за иммунную реакцию, приводящую к образованию антител. Другая теория (или по меньшей мере один из факторов) состоит в том, что чем больше конъюгат, тем большее снижение иммунного ответа получается в итоге.

Полимерными молекулами, присоединёнными к полипептиду, могут быть любые пригодные полимерные молекулы с молекулярной массой, определённой в соответствии с настоящим изобретением, в том числе природные и синтетические гомополимеры, такие как полиолы (например, поли-OH), полиамины (например, поли-NH_2) и поликарбоновые кислоты (например, поли-COOH), а также гетерополимеры, т.е. полимеры, содержащие одну или более из других связывающихся групп (например, гидроксильную группу и аминогруппы).

Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из группы, содержащей полиалкиленоксиды (ПАО), такие как полиалкиленгликоли (ПАГ), в том числе полиэтиленгликоли (ПЭГ), метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ) и полипропиленгликоли, ПЭГ-глицидиловые эфиры (Epox-ПЭГ), ПЭГ-оксикарбонилимидазол (CDI-ПЭГ), разветвлённые полиэтиленгликоли (ПЭГs), поливиниловый спирт (ПВС), поликарбоксилаты, поливинилпирролидон, поли-D,L-аминокислоты, сополимер полиэтилена с ангидридом малеиновой кислоты, сополимер полистирола с ангидридом малеиновой кислоты, декстраны, в том числе карбоксиметилдекстраны, гепарин, гомологичный альбумин, целлюлозы, в том числе метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиэтилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу, гидролизаты хитозана, крахмалы, такие как гидроксиэтилкрахмалы и гидроксипропилкрахмалы, гликоген, агарозы и их производные, камедь гуара, пуллулан, инулин, ксантановую камедь, каррагинан, пектин, гидролизаты альгиновой кислоты и биополимеры.

Предпочтительными полимерными молекулами являются нетоксичные полимерные молекулы, такие как метоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ), для которого, кроме того, нужны относительно простые химические подходы, чтобы осуществить его ковалентное связывание с реакционными группами на поверхности фермента.

Предпочтительными полимерными молекулами являются обычно рассматриваемые полиалкиленоксиды (ПАО), такие как полиэтиленоксиды (такие как ПЭГ и, в особенности, мПЭГ), поскольку эти полимерные молекулы, в сравнении с полисахаридами, такими как декстран, пулуллан и подобные им, имеют небольшое количество реакционноспособных групп, способных обеспечить сшивание.

B. Профили экспрессии sHASEGP в тканях

Хотя первоначально полагали, что sHASEGP человека специфически находится в яичках, применение более чувствительного анализа методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) позволило установить, что он экспрессируется во многих тканях человека. Транскрипция sHASEGP обнаружена в продолговатом мозгу (головной мозг), эндотелии микрокапилляров, простате, молочной железе, сетчатке глаза, скоплениях меланоцитов человека, сердце плода и беременной матке. sHASEGP экспрессируется также в опухолях половых клеток. Для определения уровней транскрипции sHASEGP в других, кроме яичек, тканях обычно требуется применение ОТ-ПЦР.

C. Анализ ферментативной активности sHASEGP

Определение гиалуронидазной активности на основе турбидиметрического микротитрования.

Гиалуронидазную активность можно обнаружить в подкисленном растворе сыворотки с помощью модифицированного турбидиметрического метода анализа. Для этого необходимы следующие реагенты (табл. 2).

Таблица 2

Стерилизованная УФ 2-кратно деионизованная вода или стерильная вода для промывания	Braun	R5000-01
Hylumed Medical – гиалуронат натрия, высокомолекулярный ГУ	Genzyme Advanced Biomaterials	4876
Гиалуроназа – референсный стандарт	USP	31200
Ацетат калия гранулированный, USP, ACS	JTBaker	2914-01
Уксусная кислота ледяная, 99+%	Sigma	A-6283
Фосфат натрия однозамещённый, моногидрат, гранулированный, USP	Mallinkrodt	7774
Фосфат натрия двузамещённый, безводный, USP	Mallinkrodt	7771
Хлорид натрия, кристаллы, GR, ACS	EMScience	SX0420-5
Желатина ферментативный гидролизат	Sigma	G-0262
Сыворотка лошади, Donor Herd, проверенная в культуре клеток, проверенная в культуре гибридом, полученная из США	Sigma	H-1270
Сывороточный альбумин человека 20%	Griffols	
Соляная кислота, реагент ACS	Sigma	H-7020
Хлорид кальция, дигидрат, гранулированный, USP, -FCC	JTBaker	1336-01

Готовят следующие реагенты.

Раствор ацетатного буфера: 14,0 г ацетата калия, 25,0 мл ледяной уксусной кислоты, вода до 1000 мл.

Раствор фосфатного буфера: 2,5 г фосфата натрия двузамещённого (одноосновного), 1,0 г безводного фосфата натрия однозамещённого (двухосновного), 8,2 г хлорида натрия, вода до 1000 мл.

Базовый раствор для разбавления фермента: 500 мл раствора фосфатного буфера и 500 мл воды.

Рабочий раствор для разбавления фермента: 33 мг гидролизованного желатина растворяют в 50 мл базового раствора для разбавления фермента - готовят не более чем за 2 ч до использования.

Буферный раствор для стабилизации образцов («раствор SSB»): 125 мкл 20% раствора человеческого сывороточного альбумина и 50 мкл 1 М раствора хлорида кальция в 50 мл рабочего раствора для разбавления фермента, тщательно перемешать.

Базовый раствор сыворотки: разбавить 1 объём лошадиной сыворотки 9 объёмами раствора ацетатного буфера. Довести pH до 3,1 добавлением 4 Н соляной кислоты и оставить раствор стоять при комнатной температуре в течение 18-24 ч. Хранить раствор при 4°С, использовать в течение 30 дней.

Рабочий раствор сыворотки: 10 мл базового раствора сыворотки в 30 мл раствора ацетатного буфера, довести температуру до комнатной.

Базовый раствор гиалуроновой кислоты: растворить натриевую соль гиалуроновой кислоты в воде до концентрации 5,0 мг/мл.

Рабочий раствор гиалуроновой кислоты: 0,75 мл базового раствора гиалуроновой кислоты в 4,25 мл раствора фосфатного буфера.

Стандартный базовый раствор: одну упаковку референсного стандартного препарата гиалуронидазы USP растворить в воде до концентрации 1000 ед./мл, разделить на аликвоты по 50 мкл, хранить при -20°С.

Стандартный рабочий раствор: 40 мкл стандартного базового раствора в 960 мкл холодного рабочего раствора для разбавления фермента, чтобы получить раствор с известной концентрацией 40 ед./мл, готовить непосредственно перед использованием в анализе.

Все образцы фермента разбавляют в планшетах на 96 ячеек «для низкого связывания белка» («Low Protein Binding»), согласно следующим предписаниям:

a) Область максимальной чувствительности данного анализа располагается между 10 и 30 ед./мл. Для того чтобы минимизировать число определений, следует повторить анализ, чтобы получить результаты, попадающие в этот интервал. Для этого в образце определяют приблизительное полное число ед./мл, а затем выбирают разбавление (полное число разведений), так что конечная концентрация составит около 20 ед./мл.

b) Минимальные объёмы проб, необходимые для проведения анализа, следующие:

фракции FPLC - 50 мкл,

надосадочные жидкости из культур ткани - 1 мл,

очищенный/концентрированный конечный материал - 10 мкл.

c) Для проб с последовательными разведениями делают разведения 1:10 с 3-кратным повтором в планшетах на 96 ячеек «для низкого связывания белка», внося пипеткой в каждую ячейку 360 мкл «раствора SSB» и 40 мкл пробы.

Для приготовления стандарта USP получают стандартную кривую USP в планшетах на 96 ячеек «для низкого связывания белка», как указано ниже (табл. 3).

Таблица 3

		Стандартная кривая USP		
Ячейки	Стандарт	Раствор для разбавления фермента (мкл)	Стандартный рабочий раствор (мкл)	Конечная концентрация (ед./мл)
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

Для получения контроля гиалуроновой кислоты в колонках 1-3 готовят его в планшетах на 96 ячеек с плоским дном следующим образом (табл. 4).

Таблица 4

		Контроль гиалуроновой кислоты	
Ячейки	Контроль	Рабочий раствор гиалуроновой кислоты (мкл)	Рабочий раствор для разбавления фермента (мкл)
H1–H3	Co01	0	60

Реакционный планшет: Рабочий раствор гиалуроновой кислоты (30 мкл на ячейку) пипетируют в микротитровальный планшет на 96 ячеек с плоским дном, используя 8-канальный дозатор на 50 мкл. Ячейки H1-H3 оставляют пустыми. В эти ячейки H1-H3 того же планшета пипетируют рабочий раствор для разбавления фермента (60 мкл на ячейку) (контроль гиалуроновой кислоты).

Рабочий раствор сыворотки: 40 мкл рабочего раствора сыворотки помещают в ячейку для переноса и затем переносят в нагревательный блок.

Стадия предварительного прогрева: Как только приготовлены оба планшета - планшет на 96 ячеек «для низкого связывания белка», содержащий разбавленные пробы, стандарты и контроли, и планшет на 96 ячеек с плоским дном, содержащий рабочий раствор гиалуроновой кислоты, их помещают в нагревательный блок и прогревают в течение 5 мин при 37°C.

Реакцию инициируют добавлением фермента к субстрату: добавляют по 30 мкл из ферментного планшета во все ячейки в колонке 1 в планшете на 96 ячеек с плоским дном (содержащем субстрат) с помощью 8-канальной пипетки на 5-50 мкл. Фермент-субстратную реакционную смесь всасывают пипеткой 5 раз (прогоняя раствор пипеткой вверх и вниз в течение первых 15 с для обеспечения полного перемешивания проб. После перемешивания фермента и субстрата наконечники пипетки выбрасывают и на дозатор для переноса помещают новый набор наконечников для следующей колонки. Отсчёт времени включают заново и в момент времени t=30 с этот процесс повторяют для колонки 2. После следующего 30-секундного интервала, t=1 мин, этот процесс повторяют для колонки 3. Процесс повторяют каждые 30 с, перемещаясь по планшету слева направо, пока все ячейки не будут содержать и фермент, и субстрат.

Остановка реакции: Когда отсчёт времени достигает t=6 мин, в каждую ячейку пипетируют 240 мкл рабочего раствора сыворотки с помощью 8-канальной пипетки для переноса на 50-300 мкл. Раствор вносят из резервуара для реагентов объёмом 50 мл в ячейки колонки 1-го планшета на 96 ячеек с плоским дном. Смесь отсасывают 3 раза (прогоняя раствор пипеткой для переноса вверх и вниз) в течение первых 10 с для обеспечения полного перемешивания. Этот процесс повторяют каждые 30 с, перемещаясь от колонки 1 до колонки 12. После завершения процедуры для последней колонки (колонка 12) реакционный планшет удаляют из нагревательного блока и помещают планшет на регистрационный столик в аппарат для автоматического просмотра планшетов при 640 нм. По ячейкам для стандартной кривой получается линейная калибровка, которая позволяет экстраполировать испытуемые пробы.

Альтернативные методы анализа для гиапуронидазы.

Микротитровальный анализ биотинилированного гиалуронана.

Свободные карбоксильные группы на остатках глюкуроновой кислоты гиалуронана биотинилируют в одностадийной реакции, используя биотин-гидразид (Pierce), сульфо-NHS (Pierce) и 1-этилдиметиламинопропилкарбодиимид (Sigma). Этот субстрат - биотинилированный гиалуронан (ГУ) ковалентно связывают во второй реакции в ячейках микротитровального планшета на 96 ячеек. После завершения ферментативной реакции остаточный субстрат определяют с помощью авидин-пероксидазной реакции, которую можно регистрировать в стандартном устройстве для считывания планшетов ELISA. Поскольку субстрат ковалентно связан с микротитровальным планшетом, отсутству-

ют такие артефакты, как pH-зависимое замещение биотинилированного субстрата. Чувствительность реакции позволяет быстро измерять гиалуронидазную активность в пробах из культивируемых клеток и биологических образцов с разбросом между параллельными анализами менее 10%.

Удельную активность гиалуронидазы выражают в единицах снижения мутности (TRU). Одна единица TRU определяется как такая величина гиалуронидазной активности, которая необходима для снижения мутности подкисленного раствора гиалуроновой кислоты и эквивалентна единице NFU Фармакологического справочника фармакопеи США (USP/National Formulary (NF XIII)). Проведенный в настоящей работе иммуноферментный анализ типа твердофазного иммуноферментного анализа ELISA может быть соотнесён с единицами TRU, NFU или единицей Национальной фармакопеи США с помощью стандартной кривой для образца гиалуронидазы (например, стандарт Фармакопеи США или Всемирной организации здравоохранения), стандартизованного по правилам Фармакопеи США. Следовательно, ферментативные активности, определённые иммуноферментным анализом типа ELISA, выражаются на самом деле в относительных TRU, поскольку в турбидиметрическом анализе ферментативная активность в действительности не измеряется (Dorfman et al. //J. Biol. Chem. 1948, v. 172, p. 367).

Многие методы анализа гиалуронидазы были основаны на измерении появления новых редуцирующих N-ацетиламиногрупп (Bonner and Cantey //Clin. Chim. Acta. 1966, v. 13, p. 746-752) либо утраты вязкости (De Salegui et al. //Arch. Biochem. Biophys. 1967, v. 121, p. 548-554) или мутности (Dorfman and Ott //J. Biol. Chem. 1948, v. 172, p. 367). С очищенными субстратами все эти методы пригодны для определений в присутствии или в отсутствие эндоглюкозамидазной активности.

По существу, очищенные субстраты гликозаминогликана могут быть также использованы в анализе по сдвигу подвижности в геле. Гликозаминогликаны смешивают с рекомбинантным sHASEGP для определения эндоглюкозидазной активности, которая приводит к сдвигу подвижности субстрата в геле. Хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматан-сульфат, гепаран-сульфат можно получить от фирмы Sigma Chemical. Гиалуронан пупочного жгутика человека можно получить от ICN. Каждый тестовый субстрат разбавляют до концентрации 0,1 мг/мл в буфере с pH в интервале 3,5-7,5. Пробы объёмом 10 мкл очищенного sHASEGP или культуральной среды от продуцирующих sHASEGP клеток смешивают с 90 мкл тестового субстрата в необходимом буфере и инкубируют в течение 3 ч при 37°C. После инкубации пробы нейтрализуют буфером для образцов (трис-ЭДТА, pH 8,0, содержащий бромфенол синий и глицерин), после чего проводят электрофорез. Гликозаминогликаны детектируют, окрашивая гели в точение ночи 0,5% альцианом голубым в 3% уксусной кислоте с последующей отмывкой краски 7% уксусной кислотой. Расщепление определяют путём сравнения подвижности субстрата в присутствии и в отсутствие фермента.

Гиалуронидазную активность можно также определять зимографией гелей с субстратом (Guentenhoner et al. //Matrix. 1992, p.388-396). В этом методе анализа образец наносят на полиакриламидный гель с SDS, содержащий гиалуроновую кислоту, и белки в образце разделяют электрофорезом. Затем гель инкубируют в буфере для анализа фермента и после этого окрашивают для определения распределения гиалуроновой кислоты в геле. Гиалуронидазная активность визуализируется как неокрашенная зона в геле с субстратом.

D. Идентификация и выделение генов для полипептида sHASEGP

Ген полипептида sHASEGP и/или его доменов может быть получен методами, хорошо известными в области выделения ДНК. Может быть применён любой метод, известный специалистам в области идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих требуемые гены. Для получения клона комплементарной ДНК (кДНК) или геномной ДНК полной длины, кодирующей полипептид sHASEGP, можно использовать любой метод, существующий в данной области. Например, можно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для размножения (амплификации) последовательности, которая может быть экспрессирована в нормальных тканях (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид sHASEGP (последовательности № 1 и 2) из библиотеки геномной ДНК или кДНК). Олигонуклеотидные праймеры, гибридизирующиеся с последовательностями на 3'-и 5'-концах идентифицированных последовательностей, могут быть использованы в качестве праймеров для амплификации с помощью ПЦР последовательностей из образца нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК, обычно библиотеки кДНК) из соответствующего источника (например, яичек, простаты, молочной железы).

ПЦР можно проводить, например, с использованием термоциклера Cetus фирмы Perkin-Elmer и полимеразы Taq (Gene Amp). Подлежащая амплификации ДНК может включать мРНК, или кДНК, или геномную ДНК из любого вида эукариот. Для использования в реакциях ПЦР можно выбрать для синтеза несколько различных вырожденных праймеров.

Возможно также варьирование степени строгости условий для гибридизации, используемых при затравке (прайминге) реакций ПЦР с целью амплифицировать гомологи нуклеиновой кислоты (например, чтобы получить последовательности для полипептидов sHASEGP из видов, отличающихся от человека, или чтобы получить последовательности человека с гомологией по отношению к последовательностям для полипептида sHASEGP), обеспечивая большую или меньшую степень подобия последовательностей нуклеиновой кислоты между известной нуклеотидной последовательностью и подлежащим выделению гомологом нуклеиновой кислоты. Для межвидовой гибридизации используют для смягчения степени стро-

гости низкую степень строгости. Для гибридизации в пределах одного вида используют условия умеренной степени строгости или высокой степени строгости. Условия могут быть определены опытным путём.

После успешной амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность для всего идентифицированного полипептида sHASEGP или его части, или же нуклеиновой кислоты, кодирующей весь полипептидный гомолог sHASEGP или его часть, этот сегмент нуклеиновой кислоты может быть подвергнут молекулярному клонированию, секвенирован и использован в качестве зонда для выделения полной кДНК или полного геномного клона. Это, в свою очередь, позволяет определить полную нуклеотидную последовательность гена, провести анализ его экспрессии и получить его белковый продукт для функционального анализа. Когда нуклеотидная последовательность определена, открытая рамка считывания, кодирующая белковый продукт гена полипептида sHASEGP, может быть определена любым методом, хорошо известным в данной области для определения открытых рамок считывания, например с помощью общедоступных компьютерных программ анализа нуклеотидных последовательностей. Как только открытая рамка считывания установлена, нетрудно определить аминокислотную последовательность белка, кодируемого открытой рамкой считывания. Таким путём можно идентифицировать нуклеотидную последовательность полных генов полипептида sHASEGP, так же как и аминокислотную последовательность белков полипептида sHASEGP и его аналогов.

Любая эукариотическая клетка в принципе может служить источником нуклеиновой кислоты для молекулярного клонирования гена полипептида sHASEGP. Нуклеиновые кислоты можно выделить из клеток позвоночных, млекопитающих, людей, свиней, кошачьих, птиц, лошадей, собак, а также из других видов приматов, насекомых, растений и иных организмов. ДНК может быть получена стандартными методами, известными в данной области, из клонированной ДНК (например из ДНК-«библиотеки»), химическим синтезом, клонированием кДНК или клонированием геномной ДНК или её фрагментов, полученных и очищенных из требуемых клеток (см., например, Sambrook et al. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; "DNA Cloning: A Practical Approach". Под ред. Glover D.M. MRL Press, Ltd. Oxford, UK, 1985, v. 1, p. 11). Полученные из геномной ДНК клоны могут содержать, кроме кодирующих участков, регуляторные и интронные участки ДНК, полученные из кДНК клоны будут содержать только экзонные последовательности. При любом источнике, ген клонируют в подходящий вектор для его воспроизводства.

При молекулярном клонировании гена из геномной ДНК получаются фрагменты ДНК, некоторые из которых кодируют требуемый ген.

ДНК может быть расщеплена в специфических местах с помощью различных ферментов рестрикции.

В качестве альтернативы для фрагментирования ДНК можно использовать ДНКазу в присутствии ионов марганца или же ДНК можно фрагментировать механически, например, с помощью ультразвука. Затем линейные фрагменты ДНК можно разделить по размерам с помощью стандартных методов, включающих (но не ограниченных ими) электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле и колоночную хроматографию.

Когда фрагменты ДНК получены, можно осуществить различными способами идентификацию фрагмента, содержащего требуемый ген.

Например, часть гена полипептида sHASEGP (любого вида), например, полученная как продукт амплификации в ПЦР в соответствии с описанным выше, или олигонуклеотид, имеющий известную нуклеотидную последовательность или её часть, или его специфическая РНК, или её фрагмент могут быть очищены и помечены, и созданные фрагменты ДНК могут быть подвергнуты скринингу путём гибридизации нуклеиновой кислоты с меченым зондом (Benton and Davis //Science. 1977, v. 196, p. 180; Grunstein and Hogness. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975, v. 72, p. 3961). Фрагменты ДНК, имеющие существенную гомологию с зондом, будут с ним гибридизироваться. Можно также идентифицировать подходящий фрагмент с помощью расщепления ферментом (ферментами) рестрикции и сопоставления размеров полученных фрагментов с размерами, ожидаемыми на основании известной карты рестрикции (если она имеется), или с помощью анализа последовательности ДНК и её сопоставления с известной нуклеотидной последовательностью для полипептида sHASEGP. Дальнейшую селекцию можно осуществить на основании свойств гена. В качестве альтернативы наличие гена может быть установлено анализом физических, химических или иммунологических свойств его экспрессированного продукта. Например, могут быть отобраны клоны кДНК или клоны ДНК, селективно гибридизирующиеся с подходящей мРНК, которые продуцируют белок, имеющий, например, похожие или идентичные электрофоретическую подвижность, поведение при изоэлектрическом фокусировании, карты протеолитического расщепления, антигенные свойства, гиалуронидазную активность. Если имеются антитела к полипептиду sHASEGP, белок можно идентифицировать по связыванию меченых антител с клонами, предположительно синтезирующими полипептид sHASEGP, с помощью метода типа твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent, assay).

Альтернативные подходы в выделении геномной ДНК для полипептида sHASEGP включают (но не ограничиваются ими) химический синтез последовательности гена по известной последовательности или получение по мРНК кодирующей полипептид sHASEGP кДНК.

Например, РНК для клонирования кДНК гена полипептида sHASEGP можно выделить из клеток, экспрессирующих белок. Затем идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в подходящий клонирующий вектор. Можно использовать большое число систем вектор-хозяин, известных в данной области. Возможные векторы включают (но не ограничиваются ими) плазмиды или модифицированные вирусы, однако векторная система должна быть совместима с использованной клеткой-хозяином. Такие векторы включают (но не ограничиваются ими) бактериофаги, такие как производные бактериофага X, или плазмиды, такие как плазмидные производные pBR322 или pUC вектора Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Вставка в клонирующий вектор может быть, например, осуществлена вшиванием (лигированием) фрагмента ДНК в клонирующий вектор, имеющий комплементарные липкие концы.

Если комплементарные сайты рестрикции, необходимые для вставки фрагмента ДНК, отсутствуют в клонирующем векторе, концы молекул ДНК можно ферментативно модифицировать. В качестве альтернативы любой необходимый сайт можно создать пришивкой нуклеотидных последовательностей (линкеров, мостиков) на концы ДНК; эти пришитые линкеры могут включать специфические синтезированные химически олигонуклеотиды, кодирующие узнаваемые последовательности для рестрикционных эндонуклеаз. В альтернативном способе расщеплённый вектор и ген полипептида sHASEGP можно модифицировать пришивкой гомополимеров на их концах.

Рекомбинантные молекулы могут быть введены в клетки-хозяева путём трансформации, трансфекции, инфекции, электропорации, осаждения кальцием или иными способами, так что создаётся большое число копий последовательности гена.

В специфических вариантах осуществления настоящего изобретения трансформация клеток-хозяев рекомбинантными молекулами ДНК, включающими изолированный ген полипептида sHASEGP, кДНК или синтезированную последовательность ДНК, обеспечивает создание многих копий гена.

Таким образом, ген может быть получен в больших количествах путём выращивания трансформантов, выделения из трансформантов рекомбинантных молекул ДНК и, при необходимости, возвращения вставленного гена из изолированной рекомбинантной ДНК.

E. Векторы, плазмиды и клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид sHASEGP или его гиалуронидазный домен, и экспрессирующие полипептиды sHASEGP векторы и клетки

Для рекомбинантной экспрессии одного или более полипептидов sHASEGP нуклеиновая кислота, содержащая всю или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид sHASEGP, может быть вставлена в подходящий экспрессирующий вектор, т.е. в вектор, содержащий необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной последовательности, кодирующей белок. Необходимые транскрипционный и трансляционный сигналы могут быть также предоставлены нативным промотором для генов sHASEGP и/или их фланкирующими участками.

Предусматриваются также векторы, содержащие кодирующую sHASEGP нуклеиновую кислоту, которая может быть введена в экспрессирующую систему, способную продуцировать растворимый sHASEGP, активный в нейтральных условиях.

Предусматриваются также клетки, содержащие векторы. Клетки включают эукариотические и прокариотческие клетки, а векторы включают такие векторы, которые пригодны для использования в них.

Предусматриваются эукариотические клетки, в том числе дефицитные по дигидрофолат-редуктазе клетки яичников китайского хомячка (DG44), содержащие векторы. Подходящие клетки включают клетки дрожжей, клетки грибков, клетки растений, клетки насекомых и клетки животных. Клетки используются для продукции полипептида sHASEGP или его гиалуронидазного домена путём (a) выращивания описанных выше клеток в условиях, при которых клетка экспрессирует кодируемый полипептид sHASEGP или гиалуронидазный домен полипептида sHASEGP, и затем (b) выделения экспрессированного белка гиалуронидазного домена. В приводимых для примера вариантах осуществления настоящего изобретения гиалуронидазный домен секретируются в культуральную среду.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматриваются векторы, которые включают последовательность нуклеотидов, кодирующую полипептид, который имеет гиалуронидазную активность и содержит весь белок sHASEGP или часть только гиалуронидазного домена, или множество его копий. Предусматриваются также векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, которая кодирует гиалуронидазный домен и дополнительные части белка sHASEGP, вплоть до белка sHASEGP полной длины и включая его, а также его множественные копии. Векторы могут быть выбраны для экспрессии белка sHASEGP или его гиалуронидазного домена в клетке или такой экспрессии, что белок sHASEGP экспрессируется как секретируемый белок. В качестве альтернативы векторы могут включать сигналы, необходимые для секреции кодируемых белков. Когда экспрессируется гиалуронидазный домен, нуклеиновая кислота присоединена к нуклеиновой кислоте, кодирующей сигнал секреции, такой как кодирующая сигнальный фактор спаривания у Saccharomyces cerevisiae или её части, или нативную сигнальную последовательность.

Для того чтобы произвести растворимый sHASEGP, активный в нейтральных условиях, необходимы клетки, способные осуществлять гликозилирование с N-связью. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки яичников млекопитающего - китайского хомячка, дефицитные по дигидрофолат-редуктазе (такие, как клетки DG44), подвергают электропорации с плазмидой, содержащей сильный промотор млекопитающих (такой как промотор цитомегаловируса, CMV), кодирующую sHASEGP нуклеиновую кислоту, за которой следуют внутренний сайт входа в рибосому, ген дигидрофолат-редуктазы мыши и последовательность полиаденилирования SV40, как показано в последовательности SEQ ID NO: 51. Затем эти клетки культивируют в химически точно охарактеризованной среде в отсутствие гипоксантина и тимидина с повышающимися концентрациями метотрексата, после чего проводят амплификацию гена.

Для экспрессии кодирующей белок последовательности могут быть использованы различные системы хозяин-вектор. Эти системы включают (но не ограничиваются ими) клеточные системы млекопитающих, заражённые вирусом (например, вирусом коровьей оспы, аденовирусом и т.д.); клеточные системы насекомых, заражённые вирусом (например, бакуловирусом); микроорганизмы, такие, как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы; или бактерии, трансформированные бактериофагом, ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК Необходимые для экспрессии элементы векторов варьируют по их силе и специфичности. В зависимости от использованной системы хозяин-вектор может быть использован любой из большого числа подходящих элементов транскрипции и трансляции. Следует отметить, что бактериальная экспрессия ДНК sHASEGP сама по себе не приводит к получению каталитически активного sHASEGP, для этого необходимо соединение с подходящей системой гликозилирования, тогда sHASEGP может быть гликозилирован искусственно.

Для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих химерный ген, в который входят подходящие сигналы контроля транскрипции/трансляции и кодирующие белок последовательности, могут быть использованы любые известные специалистам в данной области методы вставления фрагментов ДНК в вектор. Эти методы могут включать технику получения рекомбинантной ДНК и синтеза in vitro и получения рекомбинантов in vivo (генетическая рекомбинация). Экспрессию последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид sHASEGP или его домены, производные, фрагменты или гомологи, можно регулировать второй последовательностью нуклеиновой кислоты, так что её гены или их фрагменты экспрессируются в хозяине, трансформированном рекомбинантной молекулой (молекулами) ДНК. Например, экспрессию белков можно контролировать любым известным в данной области промотором/энхансером. В специфическом варианте осуществления настоящего изобретения промотор не является нативным по отношению к генам для полипептида sHASEGP. Промоторы, которые могут быть использованы, включают (но не ограничиваются ими)

ранний промотор CV40 (Benoist and Chambon //Nature. 1981, v. 290, p. 304-310), содержащийся в 3'-концевом длинном повторе вируса саркомы Роуза (Yamamoto et al. //Cell. 1980, v. 22, p. 787-797), промотор тимидин-киназы вируса герпеса (Wagner et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, v. 78, p. 1441-1445), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster et al. //Nature. 1982, v. 296, p. 39-42);

промоторы прокариотических экспрессирующих векторов, такие как промотор гена β-лактамазы (Villa-Kamaroff et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978, v. 75, p. 3727-3731); или

промотор TAC (Deboer et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, v. 80, p. 21-25); (см. также "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" //Scientific American. 1980, v. 242, p. 79-94);

растительные экспрессирующие векторы, содержащие промотор опалин-синтетазы (Herrera- Estrella et al. //Nature. 1984, v. 303, p. 209-213) или промотор 35S РНК вируса цветной капусты (Garder et al. //Nucleic Acids Res. 1981, v. 9, p. 2871), и промотор фотосинтетического фермента рибулозобифосфат-карбоксилазы (Herrera-Estrella et al. //Nature. 1984, v. 310, p. 115-120);

промоторные элементы из дрожжей и других грибов, такие как промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор фосфоглицерин-киназы, промотор щелочной фосфатазы, и следующие области контроля транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных:

контрольную область гена эластазы I, активную в гроздевидных клетках поджелудочной железы (Swift et al. //Cell. 1984, v. 38, p. 639-646; Omitz et al. //Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986, v. 50, p. 399- 409; MacDonald //Hepatology. 1987, v. 7, p. 425-515);

контрольную область гена инсулина, активную в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan et al. //Nature. 1985, v. 315, p. 115-122), контрольную область гена иммуноглобулина, активную в лимфоидных клетках Grosschedl et al. //Cell. 1984, v. 38, p. 647-658; Adams et al. //Nature. 1985, v. 318, p. 533-538; Alexander et al. //Mol. Cell Biol. 1987, v. 7, p. 1436-1444), контрольную область вируса опухоли молочной железы мыши, активную в клетках яичников, молочной железы, лимфоида и сосков (Leder et al. //Cell. 1986, v. 45, p. 485-495), контрольную область гена альбумина, активную в печени (Pinckert et al. //Genes and Devel. 1987, v. 1, p. 268-276), контрольную область гена альфа-фетопротеина, активную в печени (Krumlauf et al. //Mol. Cell. Biol. 1985, v. 5, p. 1639-1648; Hammer et al. //Science. 1987, v. 235, p. 53-58), контрольную область гена альфа-1 антитрипсина, активную в печени (Kelsey et al. //Genes and Devel. 1987, v. 1, p. 161-171), контрольную область гена бета-глобина, активную в миелоидных клетках

(Mogram et al. //Nature. 1985, v. 315, p. 338-340; Kollias et al. //Cell. 1986, v. 46, p. 89-94), контрольную область гена основного белка миелина, активную в олигодендроцитных клетках мозга (Readhead et al. //Cell. 1987, v. 48, p. 703-712), контрольную область гена лёгкой цепи 2 миозина, активную в скелетных мышцах (Sani //Nature. 1985, v. 314, p. 283-286), и контрольную область гена высвобождающего гонадотропин гормона, активного в дельта-клетках гипоталамуса (Mason et al. //Science. 1986, v. 234, p. 1372-1378).

В специфическом варианте осуществления настоящего изобретения использован вектор, который содержит промотор, функционально присоединённый к нуклеиновым кислотам, кодирующим полипептид sHASEGP или его домен, фрагмент, производное или гомолог, одно или более мест начала репликации и, по усмотрению, один или более из селектирующих маркеров (например, ген устойчивости к антибиотику).

Для эффективной трансляции последовательности sHASEGP также могут быть нужны специфические сигналы инициации. Эти сигналы включают инициирующий кодон ATG и прилегающие к нему последовательности. В тех случаях, когда в подходящий экспрессирующий вектор вставлены последовательность sHASEGP, её инициирующий кодон и восходящие последовательности, может не быть необходимости в дополнительных сигналах контроля трансляции. Однако в тех случаях, когда вставлена только кодирующая последовательность или её часть, должны быть добавлены экзогенные (внешние) сигналы контроля транскрипции, в том числе инициирующий кодон ATG. Кроме того, инициирующий кодон должен быть в правильной рамке считывания, чтобы обеспечить транскрипцию всей вставки. Экзогенные элементы регуляции транскрипции и инициирующие кодоны могут иметь различное происхождение - они могут быть и природными, и синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить введением энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (Scharf D. et al. //Results Probl. Cell Differ. 1994, v. 20, p. 125-162; Bittner et al. //Methods in Enzymol. 1987, v. 153, p. 516-544).

Кроме того, в выборе штамма клеток-хозяев могут учитываться его способность модулировать экспрессию вставленных последовательностей или осуществлять процессинг (модификацию) экспрессированного белка нужным образом. Такие модификации полипептида включают (но не ограничиваются ими) ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. Посттрансляционная модификация, в которой преобразуется «предварительная» форма белка, может также быть важна для правильной вставки, сворачивания и/или функционирования. Различные линии клеток-хозяев, такие как CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MDCK, 293, WI38 и др., имеют специфические клеточные структуры и характерные для них механизмы для таких посттрансляционных процессов и могут выбираться таким образом, чтобы обеспечить правильные модификацию и процессинг внедрённых чужеродных белков.

Для длительной продукции с высоким выходом рекомбинантных белков предпочтительна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют sHASEGP, можно трансформировать экспрессирующими векторами, содержащими вирусные области начала репликации или экзогенные элементы регуляции экспрессии и пригодный для селекции маркерный ген. После введения вектора клеткам можно дать расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед переносом их в селективные среды. Задача пригодного к селекции маркера состоит в том, чтобы придать клеткам устойчивость в селектирующих условиях, и его присутствие позволяет вырастить и отобрать клетки, которые успешно экспрессируют внедрённые последовательности. Пролиферацию устойчивых агрегатов стабильно трансформированных клеток можно получить с помощью техники культур ткани, подходящей для данного типа клеток.

Для выделения линий трансформированных клеток пригодно любое число систем селекции. Они включают (но не ограничиваются ими) гены тимидин-киназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al. //Cell. 1977, v. 11, p. 223-232) и аденин-фосфорибозилтрансферазы (Lowy I. et al. //Cell. 1980, v. 22, p. 817-823), которые могут быть использованы соответственно в клетках TK или APRT. Как основу для селекции можно также использовать устойчивость к антиметаболитам, антибиотикам или гербицидам. Например, DHFR привносит устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, v. 77, p. 3567-3570); npt придаёт устойчивость к аминогиликозидам неомицину и G-418 (Colbere-Garapin F. et al. //J. Mol. Biol. 1981, v. 150, p. 1-14), a als или pat обеспечивают устойчивость соответственно к хлорсульфурону и фосфинотрицин-ацетилтрансферазе (Murry, см. выше). Были описаны и другие пригодные для селекции гены, например trpB, который позволяет клеткам утилизировать индол вместо триптофана, или hisD, который даёт возможность клеткам утилизировать гистинол вместо гистидина (Hartman S. And Mulligan R.C. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, v. 85, p. 8047-8051). В последнее время, благодаря использованию видимых маркеров, приобрели популярность такие маркерные системы, как антоцианины, бета-глюкуронидаза и её субстрат GUS и люцифераза и её субстрат люциферин, которые широко используются не только для идентификации трансформантов, но также и для количественной оценки уровня преходящей или стабильной экспрессии белка, присущей конкретной векторной системе (Rhodes C.A. et al. //Methods Mol. Biol. 1995, v. 55, p. 121-131).

Идентификация трансформантов, содержащих полинуклеотидную последовательность.

Хотя присутствие/отсутствие экспрессии маркерного гена позволяет предположить, что представляющий интерес ген также присутствует, наличие и экспрессию активного гена sHASEGP необходимо подтверждать. Например, если последовательность sHASEGP вставлена внутри последовательности маркерного гена, содержащие последовательность sHASEGP рекомбинантные клетки могут быть идентифицированы по отсутствию функции маркерного гена. В качестве альтернативы маркерный ген может быть помещён в стыке с последовательностью sHASEGP под контролем одного промотора. Экспрессия маркерного гена в ответ на индукцию или селекцию обычно указывает на полноценную экспрессию тандема с последовательностью sHASEGP. Свидетельство о наличии должным образом гликозилированного активного в нейтральных условиях sHASEGP может быть получено на основании измерений ферментативной активности sHASEGP в культуральной среде при подходящих условиях.

Очистка sHASEGP.

Клетки-хозяева, трансформированные нуклеотидной последовательностью для sHASEGP, можно культивировать в условиях, необходимых для экспрессии и выделения кодированного белка из клеточной культуры. Продуцируемый рекомбинантной клеткой белок предпочтительно секретируется, но он может и оставаться внутри клеток, в зависимости от нуклеотидной последовательности и/или использованного вектора. Специалистам в данной области понятно, что содержащие последовательность для sHASEGP экспрессирующие векторы могут быть сконструированы с сигнальными последовательностями, которые способствуют прямой секреции sHASEGP через мембрану прокариотических или эукариотических клеток. В других рекомбинантных конструкциях последовательность для sHASEGP может быть присоединена к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидный домен, который облегчит очистку растворимых белков (Kroll D.J. et al. //DNA Cell Biol. 1993, v. 12, p. 441-453; см. дискуссию по векторам infra, содержащим последовательности для слитых белков).

sHASEGP может быть также экспрессирован как рекомбинантный белок с одним или более добавочными полипептидными доменами, добавленными для облегчения очистки белка. Такие облегчающие очистку домены включают (но не ограничиваются ими) хелатирующие металл пептиды, такие как модули гистидин-триптофан, которые позволяют вести очистку на иммобилизованных металлах, домены белка А, которые позволяют вести очистку на иммобилизованном иммуноглобулине, и домен, используемый в системе FLAGS с удлинением и аффинной очисткой (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Вставка последовательностей для расщепляемого линкера, такого, как фактор ХА или энтерокиназа (Invitrogen, San Diego, Calif.) между последовательностями для обеспечивающего очистку домена и sHASEGP, полезна для облегчения очистки. Один из таких экспрессирующих векторов обеспечивает экспрессию содержащего sHASEGP слитого белка и содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую 6 остатков гистидина, за которыми следуют последовательности для тиоредоксинового и энтерокиназного сайтов расщепления. Остатки гистидина обеспечивают очистку на IMIAC (immobilized metal ion affinity chromatography, аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла, описанная Porath et al. //Protein Expression and Purification. 1992, v. 3, p. 263-281), тогда как энтерокиназный сайт расщепления представляет способ очистки хемокина из слитого белка.

Кроме продукции на основе рекомбинантной техники, фрагменты sHASEGP можно получать прямым пептидным синтезом с помощью твердофазного метода (см. Stewart et al. //"Solid-Phase Peptide Synthesis". W.H. Freeman Co. San Francisco, 1969; Merrifield J. //J. Am. Chem. Soc. 1963, v. 85. p. 2149-2154). Синтез белка in vitro может быть осуществлён как вручную, так и в автоматическом режиме. Автоматизированный синтез может быть осуществлён, например, в пептидном синтезаторе Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) в соответствии с инструкциями производителя. Различные фрагменты sHASEGP можно синтезировать химически по отдельности и затем объединить с помощью химических методов, получая молекулу полной длины.

Экспрессирующие векторы, содержащие кодирующие последовательности или их части для полипептида sHASEGP, получают, например, субклонированием кодирующих частей в сайт расщепления рестриктазой EcoRI каждого из трёх векторов PGEX (экспрессирующие векторы для глутатион S-трансферазы (Smith and Johnson //Gene. 1988, v. 7, p. 31-40)). Это позволяет экспрессировать продукты в правильной рамке считывания. Приводимые для примера векторы и системы для экспрессии гиалуронидазных доменов полипептидов sHASEGP включают хорошо известные векторы Pichia (их можно приобрести, например, в Invitrogen, San Diego, CA), в особенности те, которые сконструированы для секреции кодируемых белков. Белок может быть также экспрессирован в цитоплазме, например в тельцах включения. Один приводимый для примера вектор описан в примерах.

Плазмиды для трансформации клеток E. coli включают, например, экспрессирующие векторы pET (см. патент США № 4952496), поставляемые фирмой Novagen, Madison, WI (см. также описание этой системы в литературе, опубликованной Novagen).

Такие плазмиды включают pET 11a, содержащую промотор T7-lac, терминатор T7, индуцибельный оператор lac E. coli и ген lac-репрессора; pET 12A-C, содержащую промотор T7, терминатор T7 и сигнал секреции OMRT E. coli; и pET 15B и pET 19B (Novagen, Madison, WI), содержащие лидерную последовательность His-Tag для использования при очистке на колонке His и тромбиновый сайт расщепления, ко-

торый обеспечивает расщепление после очистки на колонке, промотор T7-lac и терминатор T7.

Векторы вводят в клетки-хозяева, такие как клетки Pichia, и бактериальные клетки, такие как E. coli, и в них экспрессируются белки. Приводимые для примера штаммы клеток Pichia включают, например, GS115. Приводимые для примера бактериальные клетки-хозяева содержат хромосомные копии ДНК, кодирующей РНК-полимеразу T7, функционально присоединённые к индуцибельному промотору, такому как промотор LacUV (см. патент США № 4952496). Такие хозяева включают (но этим не ограничиваются) лизогенный штамм E. coli BL21 (DE3).

Домены, производные и аналоги sHASEGP могут быть произведены различными методами, известными в данной области. Например, как только идентифицирована рекомбинантная клетка, экспрессирующая полипептид sHASEGP или его домен, фрагмент или производное, продукт индивидуального гена может быть выделен и проанализирован. Это достигается методами анализа, основанными на физических и/или функциональных свойствах белка, включая (но не ограничиваясь ими) введение в продукт радиоактивной метки с последующим анализом с помощью электрофореза в геле, иммунологический анализ, сшивку меченого продукта с маркером и анализ протеолитической активности.

Полипептиды sHASEGP могут быть выделены (либо из природных источников, либо из рекомбинантных клеток-хозяев, экспрессирующих комплексы белков) и проанализированы стандартными методами, известными в данной области, включая (но не ограничиваясь ими) колоночную хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гельпроникающую, обратнофазную, высокого давления и быстрой подвижности белков в жидкости), дифференциальное центрифугирование, дифференциальное осаждение или любой другой стандартный метод, применяемый для очистки белков.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения sHASEGP можно очистить до гомогенности из химически определённой культуральной среды трансфицированных HZ24 и селектированных на фоне метатрексата клеток DG44 путём

1) диафильтрации с тангенциальным потоком,

2) связывания и элюирования при анионообменной хроматографии,

3) хроматографии в потоке на фенилсефарозе,

4) связывания и элюирования при хроматографии на оксиапатите.

Функциональные свойства могут быть определены с помощью любого подходящего анализа, известного в данной области.

В качестве альтернативы, как только идентифицированы полипептид sHASEGP, или его домен, или производное, аминокислотная последовательность белка может быть выведена из нуклеотидной последовательности гена, их кодирующего. В итоге белок, или его домен, или производное можно синтезировать известными в данной области стандартными химическими методами (см., например, Hunkapiller et al. //Nature. 1984, v. 310, p. 105-111) с последующим гликозилированием in vitro.

Манипуляции с последовательностями полипептида sHASEGP могут быть выполнены на уровне белка. В настоящей работе рассматриваются также белки полипептида sHASEGP, его домены, производные или аналоги, или их фрагменты, избирательно модифицированные в ходе или после трансляции, например путём гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, ПЭГилирования, модификации путём введения известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела или иного клеточного лиганда.

Любую из множества химических модификаций можно осуществить известными методами, включающими (но не ограниченными этим) специфическое химическое расщепление цианоген-бромидом, трипсином, химотрипсином, папаином, V8, $NaBH_4$, ацетилирование, формилирование, окисление, восстановление, метаболический синтез в присутствии туникамицина или модификацию другими подобными агентами.

Кроме того, домены, аналоги и производные полипептида sHASEGP могут быть синтезированы химически. Например, пептид, соответствующий части полипептида sHASEGP, включающий требуемый домен или направляющий требуемую активность in vitro, может быть синтезирован с помощью пептидного синтезатора.

Более того, при необходимости, в полипептидную последовательность sHASEGP могут быть введены неклассические аминокислоты или химические аналоги аминокислот в виде замещений или добавок. Неклассические аминокислоты включают (но не ограничиваются ими) D-изомеры обычных аминокислот, α-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту (Abu), 2-аминомасляную кислоту (ε-Abu), 6-аминогексанойную кислоту (ε-Ahx), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, оксипролин, саркозин, ситруллин, цистеиновую кислоту, трет-бутилглицин, трет-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, β-аланин, фтор-аминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как Cα-метиламинокислоты, Nα-метиламинокислоты и, вообще, аналоги аминокислот. Кроме того, аминокислоты могут быть D (правовращающими) или L (левовращающими).

В тех случаях, когда ожидается, что природные продукты являются мутантными, или когда они выделены из новых видов, аминокислотную последовательность полипептида sHASEGP, выделенного из

природного источника, а также экспрессированного in vitro, или экспрессированного с синтезированных экспрессирующих векторов in vivo или in vitro, можно определить из анализа последовательности ДНК или, альтернативно, прямым секвенированием выделенного белка. Такой анализ может быть произведён секвенированием вручную или с помощью автоматического секвенатора аминокислот.

Модификации.

В настоящей работе рассматриваются различные модификации полипептидов и доменов sHASEGP. Кодирующую sHASEGP молекулу нуклеиновой кислоты можно модифицировать на основе любой из многочисленных стратегий, известных в данной области (Sambrook et al. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Последовательности могут быть расщеплены в подходящих местах с помощью рестрикционной эндонуклеазы (эндонуклеаз) с последующей, если это требуется, ферментативной модификацией, выделены и лигированы in vitro. При получении гена, кодирующего домен, производное или аналог sHASEGP, следует озаботиться тем, чтобы обеспечить в модифицированном гене - в той его области, которая кодирует требуемую активность, сохранение исходной трансляционной рамки считывания, не прерванной стоп-сигналами трансляции.

Кроме того, кодирующие sHASEGP молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мутированы in vitro или in vivo, чтобы создать и/или разрушить последовательности, необходимые для инициации или терминации трансляции, или чтобы получить вариации в кодирующей области, и/или сформировать новые сайты для рестрикционных эндонуклеаз, или разрушить предсуществующие сайты, чтобы облегчить дальнейшую модификацию in vitro. Также рассматриваются, как в настоящей работе описано, мутеины с изменениями первичной структуры, такими как замещения остатков Cys и удаление или добавление сайтов гликозилирования; sHASEGP с последовательностью SEQ ID NO: 1 имеет семь сайтов потенциального гликозилирования. Такие мутации могут быть получены с помощью любой известной в данной области техники мутагенеза, включая (но не ограничиваясь ими) химический мутагенез, сайт-специфический мутагенез in vitro (Hutchinson et al. //J. Biol. Chem. 1978, v. 253, p. 6551-6558) и использование линкеров TABE (Pharmacia). В одном из осуществлений, например, полипептид sHASEGP или его домен модифицирован так, чтобы включить флуоресцентную метку. В других конкретных осуществлениях полипептид sHASEGP модифицирован так, чтобы получить гетеробифункциональный агент, причём такой гетеробифункциональный агент может быть использован для сшивания участников образования комплекса.

F. Создание функционально активного гликозилированного sHASEGP с N-связанными фрагментами молекулы сахара

Для создания каталитически стабильного белка необходим должным образом N-гликозилированный sHASEGP человека. Гликозилирование sHASEGP с N-связью можно осуществить различными способами. sHASEGP можно гликозилировать введением кодирующих sHASEGP нуклеиновых кислот в клетки эукариотического происхождения, способные осуществлять правильное гликозилирование с N-связыванием, или в качестве альтернативы приведением полипептида sHASEGP в контакт с бесклеточными экстрактами или очищенными ферментами, способными вставлять требуемые N-связанные фрагменты молекулы сахара.

Селекция экспрессирующей системы.

Системы экспрессии эукариотических клеток различаются по степени и типу гликозилирования, которое они вводят в эктопический (смещенный) экспрессированный полипептид. Клетки CHO, например, с высокой эффективностью вводят N-связанное гликозилирование в активный полипептид sHASEGP.

Дополнительные эукариотические системы экспрессии, вводящие несвязанное гликозилирование с созданием продукта - функционального sHASEGP, можно тестировать, вводя в указанные клетки экспрессирующую плазмиду с последовательностью для человеческого sHASEGP и определяя активность в нейтральных условиях. Надлежащее N-связанное гликозилирование можно обнаружить с помощью анализа методом FACE высвобожденных PNGазой олигосахаридов. Далее в настоящей работе предлагаются параметры (профили) гликозилирования каталитически активных sHASEGP. Проверить гликозилирование можно также, обрабатывая sHASEGP из указанных клеток PNGазой F или выращивая такие клетки на среде с туникамицином после введения кодирующих sHASEGP нуклеиновых кислот.

N-гликозилирование полипептида sHASEGP in vitro.

Полипептид sHASEGP может быть N-гликозилирован путём контакта полипептида sHASEGP с бесклеточным экстрактом (например, с мембранами микросом собак), содержащим активность, способную переносить N-связанные сахара на полипептид sHASEGP, или в коммерчески доступной системе сопряжённых транскрипции и трансляции (Promega, Madison, WI).

Считается, что олигосахариды имеют редуцирующий конец и нередуцирующий конец, вне зависимости от того, является ли сахарид на редуцирующем конце действительно редуцирующим сахаром. В соответствии с принятой номенклатурой олигосахариды изображены в настоящей работе с нередуцирующим концом слева и редуцирующим концом справа. Все описанные в настоящей работе олигосахариды приведены с названием или аббревиатурой для нередуцирующего сахарида (например, Gal),

за которым следует конфигурация гликозидной связи (альфа или бета), связь в кольце, положение в кольце редуцирующего сахарида, участвующего в связи, и затем название или аббревиатура редуцирующего сахарида (например, GlcNAc). Связь между двумя сахарами может быть обозначена, например, как 2, 3, 2→.3 или (2, 3). Каждый сахарид является пиранозой.

Термин «N-связанный фрагмент молекулы сахара», как он использован в настоящей работе, относится к олигосахариду, присоединённому к sHASEGP посредством амидного азота в остатках Asn. N-связанные олигосахариды подразделяются на несколько главных типов (олигоманнозные, комплексные, гибридные, сульфированные), которые все имеют сердцевины $(Man)_3$-GlcNAc-GLcNAc-, присоединённые через атом амидного азота в остатках Asn, находящихся в пределах последовательностей -Asn-Xaa-Thr/Ser- (где Xaa - это не Pro). Часто сайты с N-связью косвенно различимы по появлению «пустого» цикла при секвенировании. Позитивная идентификация может быть осуществлена после высвобождения олигосахарида ферментом PNGазой F, которая превращает гликозилированный Asn в Asp. После удаления PGNазы F N-связанные олигосахариды могут быть очищены с помощью хроматографии на биогеле P-6, а олигосахаридный пул подвергается препаративной анионообменной хроматографии при высоком pH (high pH anion exchange chromatography, HPAEC) (Townsend et al. //Anal. Biochem. 1989, v. 182, p. 1-8). С помощью HPAEC можно разделить некоторые изомеры олигосахаридов. На хроматограммах HPAEC остатки фукозы смещаются к более раннему элюированию, тогда как остатки дополнительной сиаловой кислоты выходят при большем времени элюирования. Путём сопутствующей обработки гликопротеинов с известной олигосахаридной структурой (например, фетуин крупного рогатого скота, кислый гликопротеин α-1, овальбумин, РНКаза B, трансферрин) можно улучшить идентификацию олигосахаридных пиков. Собранные олигосахариды можно охарактеризовать сочетанием анализов состава и метилирующих связей (Waeghe et al. //Carbohydr. Res. 1983, v. 123, p.281-304), различая аномерные конфигурации с помощью спектроскопии ЯМР (Van Halbeek //Methods Enzymol. 1993, v. 230).

В качестве альтернативы можно идентифицировать олигосахариды с помощью соединённого с флуоресценцией электрофореза углеводов (fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis, FACE) (см. Callewaert et al. //Glycobiology. 2001, v. 11, p. 275-281).

G. Детектирование и получение характеристик N-связанных фрагментов молекулы сахара на sHASEGP

Определение того, действительно ли белок гликозилирован является первым этапом в анализе гликана гликопротеина. В качестве конечного этапа перед секвенированием белка наилучшим методом стал электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). При SDS-PAGE гликозилированные белки часто движутся как размытые зоны. Считают, что существенное уменьшение ширины зоны и изменение положения зоны после обработки пептид-N4-(N-ацетил-D-глюкозаминил)аспарагин амидазой (PNGазой F) является хорошей диагностикой N-связанного гликозилирования. Если преобладают другие типы гликозилирования, необходимо использовать другие подходы. Методы блотирования (отпечатывания) с использованием лектинов представляют собой подход, не зависящий от класса гликозилирования (N или O). Лектины (связывающие углеводы белки) из разных растительных тканей имеют и высокое сродство, и узкую специфичность по отношению к широкому кругу определённых сахарных эпитопов, обнаруженных в гликанах гликопротеинов (Cummings R.D. //Methods in Enzymol. 1994, v. 230, p. 66-86). Если они конъюгированы с биотином или дигоксигенином, их легко идентифицировать на мембранных отпечатках (блотах) по колориметрической реакции с использованием антител к авидину или дигоксигенину, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Haselbeck et al. //Methods in Mol. Biol. 1993, v. 14, p. 161-173); этот метод аналогичен реакциям с конъюгатами вторичные антитела-щелочная фосфатаза, применяемым при вестерн-блотировании. Скрининг с набором лектинов, имеющих хорошо установленную специфичность, может дать важную информацию об углеводной добавке в гликопротеине. Важно, что интенсивность окраски достаточно высока, так что на мембранном отпечатке после SDS-PAGE легко обнаруживаются 10-50 нг гликопротеина. Хотя лектины проявляют очень высокое сродство к соответствующим им лигандам, некоторые из них обнаруживают значительную склонность соединяться со структурно родственными эпитопами. Поэтому важно при выборе набора лектинов тщательно учитывать возможность перекрёстной реакционности и применять те лектины, у которых наиболее высока способность отличать комплексные, гибридные и содержащие большое количество маннозы N-связанные гликаны от O-связанных структур.

Анализ моносахаридов можно также использовать для того, чтобы определить, гликозилирован ли sHASEGP, и он, так же, как в случае анализа с лектинами, даёт дополнительную информацию о структурных особенностях. Количественный анализ состава моносахаридов:

i) идентифицирует гликозилированные белки,

ii) даёт молярное отношение индивидуальных сахаров к белку,

iii) позволяет предположить, в ряде случаев, наличие различных олигосахаридных классов,

iv) является первым этапом в выборе стратегии установления структуры,

v) даёт меру соответствия продукции задачам терапии с помощью рекомбинантного гликопротеина.

В последние годы для определения моносахаридного состава широко применяли анионообменную хроматографию при высоком pH с импульсным амперометрическим детектированием (high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD) (Townsend et al. //"Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". Под ред. Z.E.I. Rassi. 1995, p. 181-209). Совсем недавно были предложены методы с введением флуорофорной метки, многие из них уже доступны в виде наборов. Отчётливым преимуществом флуоресцентных методов является повышение чувствительности (в 50 раз). Один потенциальный недостаток состоит в том, что различные моносахариды могут иметь различную чувствительность к флурофору в реакции связывания - либо в гидролизате, либо во внешней стандартной смеси. Однако этот подход привлекателен из-за повышения чувствительности и способности идентифицировать в малой части общего количества имеющегося гликопротеина, какие моносахариды в нём присутствуют, а также перспективы дальнейшего повышения чувствительности при индукции флуоресценции лазером.

Анализ состава моносахаридов в малых количествах sHASEGP лучше всего проводить на мембранах PVDF (PSQ) после либо электроблотирования (Weitzhandler et al. //J. Biol. Chem. 1993, v. 268, p. 5121-5130), либо (если предстоит анализировать меньшие аликвоты) на точечных блотах (dot blots). PVDF - это идеальный матрикс для анализа углеводов, поскольку ни моносахариды, ни олигосахариды не связываются с мембраной, когда они высвобождены кислотным или ферментативным гидролизом.

Анализ методом FACE - это эффективный способ определения параметров гликозилирования sHASEGP. Одним из таких механизмов является FACE® - определение профилей N-связанных олигосахаридов (Prozyme) с помощью 30% олигосахаридных гелей. Для детектирования параметров гликозилирования sHASEGP можно использовать олигосахариды, отщепленные от 100 мкг гликопротеинов ферментативным расщеплением N-гликаназой (известна также как PNGаза), меченые флуорофором ANTC и разделённые электрофорезом. Относительные положения зон олигосахаридов определяют параллельным прогоном образца и разбавлений образца со стандартной смесью олигосахаридов, дающей после электрофореза так называемую «лестницу» зон, где определённое пройденное расстояние соответствует определённой степени полимеризации (СП).

H. Способы скрининга для идентификации соединений, модулирующих активность sHASEGP

В настоящей работе приведены для примера и описаны несколько типов анализа. Понятно, что в других анализах могут быть использованы гиалуронидазные домены. В настоящей работе показано, однако, что гиалуронидазные домены проявляют каталитическую активность. Сами по себе они идеальны для анализов скрининга in vitro. Они могут быть также использованы в анализах связывания.

Предполагается использование зимогенов sHASEGP полной длины, активированных ферментов и гиалуронидазных доменов в любых известных специалистам в данной области анализах скрининга, в том числе тех, которые предлагаются в настоящей работе. Поэтому подразумевается, что в дальнейшем описании, если оно ориентировано на анализ гиалуронидазы, применяется использование одноцепочечного гиалуронидазного домена или каталитически активной части любой гиалуронидазы, включая sHASEGP. В настоящей работе предлагаются и другие способы анализа, такие как способы анализа связывания, в особенности для использования с sHASEGP, включая его любые варианты, такие как его варианты, полученные сплайсингом.

1. Анализы каталитической активности для идентификации агентов, модулирующих гиалуронидазную активность белка sHASEGP.

В настоящей работе предлагаются способы идентификации модулятора каталитической активности sHASEGP, в особенности одноцепочечного гиалуронидазного домена или его каталитически активной части. Способы могут быть осуществлены следующим образом: приведение sHASEGP - зимогена полной длины или активной формы, и в особенности его одноцепочечного домена, в контакт с субстратом для sHASEGP в присутствии испытуемого вещества и определение протеолиза субстрата, причём оценивается активность sHASEGP, которая сравнивается с активностью контроля.

Например, контролем может быть активность sHASEGP, определяемая путём контактирования sHASEGP, в том числе зимогена полной длины или активированной формы, и в особенности его одноцепочечного домена, с субстратом для sHASEGP и определения протеолиза субстрата, причём оценивается активность sHASEGP. Сравниваются результаты, полученные в присутствии и в отсутствие испытуемых соединений. Разница в активности указывает на то, что испытуемое вещество модулирует активность sHASEGP. Активаторы расщепления под действием sHASEGP также имеются в виду; такие анализы обсуждаются ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения множество испытуемых соединений подвергаются просмотру (скринингу) одновременно в описанном выше способе скрининга. В другом осуществлении sHASEGP выделен из клетки-мишени как средство для последующей идентификации агентов, которые потенциально специфичны к клетке-мишени.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения испытуемым соединением является лекарственное соединение, и в соответствии с этим разница в активности sHASEGP, измеренной в присутствии и в отсутствие испытуемого соединения указывает на то, что клетка-мишень реагирует на действие лекарственного соединения.

Один из способов включает этапы (a) контактирования полипептида sHASEGP или его гиалуронидазного домена с одним или с множеством из испытуемых соединений в условиях, способствующих взаимодействию между лигандом и соединениями, и (b) идентификации одного или более соединений из множества, которое(ые) специфически связывается(ются) с лигандом.

Другой предлагаемый в настоящей работе способ включает этапы (a) контактирования полипептида sHASEGP или его гиалуронидазного домена с субстратом для полипептида sHASEGP и определения разрушения субстрата, посредством чего оценивается активность полипептида sHASEGP; (b) контактирования полипептида sHASEGP с субстратом для полипептида sHASEGP в присутствии испытуемого вещества и определения степени разрушения субстрата, посредством чего оценивается активность полипептида sHASEGP; и (c) сравнения активности полипептида sHASEGP, оцененной на этапах (a) и (b), причём если активность, измеренная на этапе (a), отличается от активности, измеренной на этапе (b), это означает, что испытуемое соединение модулирует активность полипептида sHASEGP.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения множество испытуемых соединений подвергаются скринингу одновременно. При сравнении активности полипептида sHASEGP в присутствии и в отсутствие испытуемого вещества для оценки того, является ли испытуемое вещество модулятором активности полипептида sHASEGP, нет необходимости измерять активность параллельно, хотя такие параллельные измерения являются типичными. Можно измерить активность полипептида sHASEGP в один момент времени и сравнить измеренную активность с установленной ранее величиной активности полипептида sHASEGP.

Например, можно измерить активность полипептида sHASEGP в присутствии испытуемого вещества и сравнить с полученным ранее значением активности полипептида sHASEGP, измеренным ранее в отсутствие испытуемого вещества, и наоборот. Для этого, например, активность полипептида sHASEGP может быть указана во вкладыше или инструкции, прилагаемым к набору для проведения анализа.

Способы отбора субстратов для конкретного sHASEGP описаны в примерах, и конкретные анализы гиалуронидазы приведены в качестве примеров.

Предлагаются наборы и содержащие наборы комплекты, по усмотрению включающие инструкции для проведения анализов. Наборы включают полипептид sHASEGP и субстрат для полипептида sHASEGP, подлежащего анализу, и, по усмотрению, реагенты для определения протеолиза субстрата. Субстраты, которыми могут быть хромогенные или флуорогенные молекулы, в том числе гликозаминогликаны, подвергаемые протеолизу конкретным полипептидом sHASEGP, могут быть идентифицированы эмпирически путём тестирования способности полипептида sHASEGP расщеплять испытуемый субстрат. Определяют субстраты, расщепляемые наиболее эффективно, т.е. при наименьшей концентрации и/или с наибольшей скоростью (или при требуемых условиях).

Дополнительно в настоящей работе предлагается комплект, содержащий описанный выше набор. Комплект по усмотрению может включать инструкции для идентификации модулятора активности полипептида sHASEGP.

2. Анализ связывания.

В настоящей работе предлагаются также способы идентификации и выделения агентов, конкретнее соединений, связывающихся с sHASEGP. Способы анализа разработаны для того, чтобы идентифицировать агенты, которые связываются с выделенным гиалуронидазным доменом (или иным, чем полипептид sHASEGP, белком, содержащим гиалуронидазный домен полипептида sHASEGP) и с активированной формой, в том числе с активированной формой, полученной из зимогена полной длины или из удлинённого гиалуронидазного домена. Идентифицированные соединения являются кандидатами или средствами для идентификации соединений для лечения расстройств и заболеваний, связанных с нарушением гиалуронидазной активности. Использованные в данных способах полипептиды sHASEGP включают любой полипептид sHASEGP, как он определён в настоящей работе, в том числе одноцепочечный гиалуронидазный домен sHASEGP или его протеолитически активную часть.

В настоящей работе предусматриваются разнообразные способы. Эти способы могут быть осуществлены либо в реакциях в растворе, либо в реакциях в твёрдой фазе, в которых полипептид(ы) sHASEGP или его (их) гиалуронидазный(ые) домен(ы) связан(ы) (либо непосредственно, либо через мостик) с твёрдым носителем. Анализы скрининга описаны в примерах и использованы для идентификации соединений-кандидатов.

Для установленных в настоящей работе задач все описанные выше анализы связывания предлагаются для sHASEGP.

В настоящей работе предусматриваются способы идентификации агента, такого как соединение, которое специфически связывается с одноцепочечным гиалуронидазным доменом sHASEGP, активированным sHASEGP полной длины, или его двухцепочечным гиалуронидазным доменом. Способ может быть осуществлён путём (a) контактирования sHASEGP с одним испытуемым агентом или с множеством испытуемых агентов в условиях, способствующих связыванию между sHASEGP и агентом; и (b) идентификации одного или более агентов в пределах множества, специфически связывающегося(ихся) с sHASEGP.

Например, при практическом применении таких способов полипептид sHASEGP смешивают с потенциальным партнёром в связывании или с фракцией клеток в условиях, обеспечивающих ассоциацию потенциально связывающихся партнёров с полипептидом. После смешивания пептиды, полипептиды, белки или другие молекулы, которые оказались связанными с sHASEGP, отделяют от смеси. Затем связывающийся партнёр, который связался с sHASEGP, может быть удалён и подвергнут дальнейшему анализу. Для того чтобы идентифицировать и выделить связывающегося партнёра, может быть использован полный белок, например полный раскрытый в настоящей работе белок с последовательностью SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы может быть использован фрагмент белка.

Разнообразные методы могут быть использованы для получения клеточных экстрактов или биологических жидкостей, таких как кровь, сыворотка, моча, пот, синовиальная жидкость, цереброспинальная жидкость и другие подобные жидкости.

Например, клетки могут быть разрушены (лизированы) с использованием либо физических, либо химических методов лизирования. Примеры физических методов лизирования включают (но не ограничиваются ими) обработку ультразвуком и механическое иссечение. Примеры способов химического лизиса включают (но не ограничиваются ими) лизис детергентами и лизис ферментами. Опытный специалист в данной области может легко адаптировать методы получения клеточных экстрактов для получения экстрактов, используемых в предлагаемых способах.

Как только клеточный экстракт приготовлен, экстракт смешивают с sHASEGP в условиях, в которых может произойти ассоциация белка со связывающимся партнёром. Могут быть использованы разнообразные условия, в том числе условия, напоминающие условия, имеющиеся в цитоплазме клеток человека или в биологической жидкости, такой как кровь. Параметры, такие как осмолярность, pH, температура и использованная концентрация клеточного экстракта, можно варьировать, чтобы оптимизировать ассоциацию белка со связывающимся партнёром. Точно также известны методы выделения представляющих интерес молекул из биологических жидкостей.

После смешивания при подходящих условиях комплекс связавшихся партнёров отделяют от смеси. Для разделения смеси могут быть применены разнообразные методы. Например, может быть произведена иммунопреципитация (иммуноосаждение) комплекса связавшихся партнёров с помощью антител, специфичных к sHASEGP. В качестве альтернативы могут быть применены стандартные химические методы разделения, такие как хроматография и седиментация (скоростная или в градиенте плотности).

После удаления присутствующих в экстракте не принявших участия в ассоциации клеточных компонентов связавшийся партнёр может быть диссоциирован из комплекса с помощью общепринятых методов. Например, диссоциацию можно осуществить, изменяя в смеси концентрацию соли или pH.

Для того чтобы помочь в отделении ассоциированных пар связывающихся партнёров от смешанного экстракта, sHASEGP можно иммобилизовать на твердофазном носителе. Например, белок может быть прикреплён к нитроцеллюлозному матриксу или к акриловым гранулам. Прикрепление белка или его фрагмента к твердофазному носителю способствует отделению пар пептид/связывающийся партнёр от других компонентов, находящихся в экстракте. Идентифицированными связывающимися партнёрами могут быть либо индивидуальный белок, либо комплекс, образованный двумя или более белками.

В качестве альтернативы молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие одноцепочечные гиалуронидазы, могут быть использованы в дрожжевой двухгибридной системе. Дрожжевая двухгибридная система может быть применена для идентификации других пар белковых партнёров и может быть легко адаптирована к применению описанных в настоящей работе молекул нуклеиновой кислоты.

В другом способе анализа связывания in vitro, в особенности для sHASEGP, использована смесь полипептидов, которая содержит, по меньшей мере, каталитический домен одного из этих белков и один или более из потенциально связывающихся мишеней или субстратов. После инкубирования смеси при подходящих условиях оценивают способность sHASEGP или его полипептидного фрагмента, содержащего каталитический домен, связываться или взаимодействовать с потенциальным субстратом. Для бесклеточных анализов связывания один из компонентов включает пригодную для обнаружения метку или соединён с ней. Метка может обеспечивать прямое обнаружение (детектирование), например радиоактивная метка, люминесцентная метка, оптическая или электронная плотность и т.д., или опосредованное обнаружение, как в случае эпитопной метки, фермента и т.д. Для обнаружения метки могут быть применены разнообразные способы, в зависимости от природы метки и других подлежащих анализу компонентов. Например, метку можно обнаруживать в связанном с твердофазным субстратом состоянии или же часть связанного комплекса, содержащую метку, можно отделить от твердофазного субстрата и после этого обнаруживать метку.

3. Обнаружение переноса сигнала.

sHASEGP, являющийся закреплённым (заякоренным) в мембране белком, может прямо или косвенно участвовать в передаче сигнала, либо прямо - как рецептор клеточной поверхности, либо косвенно - путём активации белков (таких, как предростовые факторы, которые могут инициировать передачу сигнала).

Кроме того, секретированный sHASEGP, такой как растворимый домен sHASEGP, описанный последовательностью SEQ ID NO: 4, может участвовать в передаче сигнала либо прямо - связываясь или

взаимодействуя с рецептором клеточной поверхности, либо косвенно - путём активации белков (таких, как предростовые факторы, которые могут инициировать передачу сигнала). Методы анализа для оценки передачи сигнала хорошо известны специалистам в данной области и могут быть адаптированы для применения к полипептиду sHASEGP.

Предлагаются способы анализа для идентификации агентов, воздействующих на передачу сигнала или изменяющих передачу сигнала, в чём они участвуют прямо или косвенно, как, например, путём активации sHASEGP стимулирующего рост фактора, в особенности полипептидом sHASEGP полной длины или его частью, достаточной для заякоривания внеклеточного домена или его функциональной части на клеточной поверхности. Такие способы анализа включают, например, анализ на основе транскрипции, в котором оценивается модуляция передаваемого сигнала путём детектирования влияния на экспрессию репортерного гена (см., например, патент США № 5436128).

4. Способы идентификации агентов, модулирующих экспрессию кодирующей sHASEGP нуклеиновой кислоты.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает способы идентификации агентов, модулирующих экспрессию кодирующей sHASEGP нуклеиновой кислоты. В таких анализах используются любые доступные средства мониторинга изменений в уровне экспрессии кодирующих sHASEGP нуклеиновых кислот.

Для мониторинга способности агента модулировать экспрессию кодирующей sHASEGP нуклеиновой кислоты могут быть использованы различные виды анализа. Например, можно проводить прямой мониторинг экспрессии мРНК путём гибридизации с нуклеиновыми кислотами. Для детектирования агентов, модулирующих экспрессию sHASEGP, могут быть также применены ферментативные анализы, как они описаны в настоящей работе.

Линии клеток повергают воздействию подлежащих исследованию агентов при подходящих условиях и длительности и выделяют стандартными методами общую РНК или мРНК (см., например, Sambrook et al. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2-е изд. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Для обнаружения различий в уровнях экспрессии РНК в клетках, экспонированных с агентом, и контрольных клетках из нуклеиновых кислот могут быть приготовлены зонды. Обычно, хотя и не обязательно, конструируют зонды, гибридизирующиеся только с целевыми нуклеиновыми кислотами в условиях высокой степени строгости. В соответствии с этим строгость условий анализа определяет степень комплементарности, которая должна существовать между двумя нитями нуклеиновой кислоты, чтобы они образовали гибрид. Степень строгости следует выбирать так, чтобы максимизировать разницу в стабильности между гибридом зонд/мишень и возможными гибридами зонд/не мишень.

Например, N- и С-концевые фрагменты sHASEGP могут быть экспрессированы в бактериях и использованы для поиска белков, связывающихся с этими фрагментами. Для использования в качестве субстрата могут быть приготовлены слитые белки, такие как слияния метки His или GST с N- или С-концевыми областями sHASEGP. Эти слитые белки могут быть пришиты, например, к гранулам глутатион-сефарозы и затем подвергнуты воздействию клеточных лизатов или биологических жидкостей. Перед лизисом клетки или биологические жидкости можно обработать агентом-кандидатом, который может модулировать sHASEGP, или белками, которые взаимодействуют с его доменами. Белки лизата, связывающиеся со слитыми белками, могут быть разделены SDS-PAGE, выделены и идентифицированы методами белкового секвенирования или масс-спектроскопии, известными в данной области.

Антитела-зонды готовят, иммунизируя подходящих млекопитающих-хозяев в подходящем иммунизационном режиме, используя пептиды, полипептиды или белки, если они имеют достаточную длину (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или более последовательных аминокислот полипептида sHASEGP, или конъюгируя их с подходящими носителями, чтобы повысить их иммуногенность. Методы приготовления иммуногенных конъюгатов с носителями, такими как бычий сывороточный альбумин (БСА), гемоцианин затворного отверстия моллюска (ГЗМ) или другие белки-носители, хорошо известны в данной области. В некоторых случаях может оказаться эффективным прямое конъюгирование с использованием, например, карбодиимидных реагентов; в других случаях для обеспечения доступности гаптена могут потребоваться сшивающие реагенты, такие как поставляемые фирмой Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Гаптеновые пептиды могут быть удлинены на амино- или карбоксильном конце остатком Cys или же остатки цистеина могут быть вкраплены в них, например, чтобы улучшить связывание с носителем.

Введение иммуногена обычно производят путём инъекции в течение подходящего периода времени и с использованием подходящих адъювантов, как это обычно принято в данной области. В ходе графика иммунизации определяют титры антител, чтобы удостовериться в достаточном образовании антител.

Антитела к пептидам могут быть получены с помощью синтетических пептидов, соответствующих, например, аминокислотам карбоксильного конца sHASEGP.

Синтетические пептиды могут быть короткими, например длиной 1-3 аминокислоты, обычно длиной по меньшей мере 4 или более аминокислотных остатка. Пептиды могут быть спарены с ГЗМ с помощью стандартных методов и введены для иммунизации животным, таким как кролики или копытные

животные. Затем поликлональные антитела могут быть очищены, например, с помощью гранул Actigel, содержащих ковалентно связанный пептид.

Хотя полученные таким путём поликлональные антисыворотки могут быть пригодными для некоторых применений, для фармацевтических композиций используют, как правило, моноклональные антитела. Линии бессмертных клеток, секретирующие необходимые моноклональные антитела, могут быть приготовлены, как хорошо известно, с помощью стандартного метода (Kohler et al. //Nature. 1975, v. 256, p. 495-497) или его модификаций, позволяющих получить бессмертные лимфоциты или клетки селезёнки. Линии бессмертных клеток, секретирующих необходимые антитела, отбирают с помощью иммуноанализа, в котором антигеном является пептидный гаптен, полипептид или белок.

Если подходящая культура бессмертных клеток, секретирующих необходимые антитела, идентифицирована, клетки можно культивировать in vitro или осуществлять продукцию in vivo с помощью асцитной жидкости. Особый интерес представляют моноклональные антитела, распознающие в sHASEGP каталитический домен или сайт (участок) активации расщепления.

Могут быть также продуцированы антитела или фрагменты. В среде с химерными клетками, ведущими происхождение от нескольких видов, могут также продуцироваться участки, связывающиеся специфически с необходимыми участками рецептора.

Анализируемые указанным выше способом агенты могут быть селектированы случайным образом или же селектированы или сконструированы целенаправленно.

Агентами могут быть, например, пептиды, малые молекулы и углеводы. Специалисту в данной области понятно, что не существует ограничений в структурной природе агентов.

Пептидные агенты, как известно в данной области, могут быть получены с помощью стандартных твердофазных методов синтеза пептидов (или синтезом в растворе). Кроме того, кодирующую эти пептиды ДНК можно синтезировать с помощью имеющихся в продаже установок для синтеза олигонуклеотидов или получить рекомбинантным способом, используя стандартные рекомбинантные системы продукции. Если в пептид необходимо включить некодируемые генетически аминокислоты, необходима продукция с применением твердофазного пептидного синтеза.

I. Способы лечения

sHASEGP, идентифицированные приведёнными в настоящей работе способами, применены для лечения или предотвращения ненормального накопления субстратов sHASEGP у животного, особенно млекопитающего, включая человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает введение млекопитающему эффективного количества гликопротеина sHASEGP, посредством чего заболевание или расстройство излечивается или предотвращается.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор sHASEGP может быть применён для лечения избыточного количества гиалуронидазной активности в нейтральных условиях. Подвергающимся лечению млекопитающим может быть человек. Предложенные в настоящей работе ингибиторы - это такие ингибиторы, которые идентифицированы анализом скрининга. Кроме того, рассматриваются антитела и антисмысловые нуклеиновые кислоты или двунитевые РНК (dsRNA), такие как RNAi.

1. Антисмысловое воздействие.

В конкретном осуществлении, как описано выше в настоящей работе, функцию полипептида sHASEGP ослабляют или подавляют (ингибируют) антисмысловыми нуклеиновыми кислотами для полипептида sHASEGP или ослабляют или предотвращают избыточную хондроитиназную активность. Предлагается терапевтическое или профилактическое применение нуклеиновых кислот длиной по меньшей мере 6 нуклеотидов, обычно до 150 нуклеотидов, которые являются антисмысловыми по отношению к гену или к кДНК, кодирующим полипептид sHASEGP или его часть.

Термин «антисмысловая» нуклеиновая кислота полипептида sHASEGP, как он использован в настоящей работе, относится к нуклеиновой кислоте, способной гибридизироваться с РНК для части полипептида sHASEGP (как правило, мРНК) вследствие некоторой комплементарности последовательностей и, как правило, при условиях высокой степени строгости. Антисмысловая нуклеиновая кислота может быть комплементарна кодирующей и/или некодирующей области мРНК полипептида sHASEGP. Такие антисмысловые нуклеиновые кислоты находят применение как лекарства, снижающие или ингибирующие функцию полипептида sHASEGP, и могут быть использованы в лечении или предотвращении расстройств, описанных выше.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты полипептида sHASEGP имеют длину по меньшей мере 6 нуклеотидов и обычно являются олигонуклеотидами (с длиной от 6 до приблизительно 150 нуклеотидов, в том числе от 6 до 50 нуклеотидов). Антисмысловая молекула может быть комплементарна всему гиалуронидазному домену или его части. Например, олигонуклеотид имеет длину по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 15 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов или по меньшей мере 125 нуклеотидов. Олигонуклеотидами могут быть ДНК или РНК, или их химерные смеси или производные, или модифицированные версии, однонитевые или двунитевые. Олигонуклеотид может быть модифицирован в основаниях, сахарах или фосфатном скелете. Олигонуклеотид может включать другие добавочные группы, такие как пептиды или агенты, способствующие транспорту через клеточную мем-

брану (см., например, Letsinger et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, v. 86, p. 6553-6556; Lemaitre et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987, v. 84, p 648-652; международную публикацию WO 88/09810, опубликованную 15 декабря 1988 г.) или через гематоэнцефалический барьер (см., например, международную публикацию WO 89/10134, опубликованную 25 апреля 1988 г.), агенты для запускаемого гибридизацией расщепления (см., например, Krol et al. //BioTechniques. 1988, v. 6, p. 958-976) или интеркалирующие агенты (см., например, Zon. //Pharm. Res. 1988, v. 5, p. 539-549).

Антисмысловая нуклеиновая кислота для полипептида sHASEGP является, как правило, олигонуклеотидом, обычно однонитевой ДНК или РНК или их аналогом, или их смесями. Например, олигонуклеотид включает последовательность, антисмысловую по отношению к части нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид sHASEGP человека. Олигонуклеотид может быть модифицирован в любом месте его структуры заместителями, широко известными в данной области.

Антисмысловой олигонуклеотид для полипептида sHASEGP может включать по меньшей мере одно модифицированное гетероциклическое основание, которое выбрано из группы, содержащей (но не ограниченной ими) 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксилметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентиладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5-апосметоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентиладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, урацил-5-оксиуксусной кислоты метиловый эфир, 3-(3-амино-3-н-2-карбоксипропил)урацил (ACP3) (w) и 2,6-диаминопурин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения олигонуклеотид включает по меньшей мере один модифицированный сахар, выбранный из группы, включающей (но не ограниченной ими) арабинозу, 2-фторарабинозу, ксилозу и гексозу. Олигонуклеотид может включать по меньшей мере один модифицированный фосфат в скелете, выбранный из фосфотиоата, фосфодитиоата, фосфамидотиоата, фосфамидата, фосфодиамидата, метилфосфоната, алкил-фосфотриэфира и формацеталя или его аналога.

Олигонуклеотид может быть α-аномерным олигонуклеотидом. α-Аномерный олигонуклеотид образует специфические двунитевые гибриды с комплементарной РНК, в которых нити параллельны друг другу (Gautier et al. //Nucl. Acids Res. 1987, v. 15, p. 6625-6641).

Олигонуклеотид может быть конъюгирован с другой молекулой, такой, как (но не исключительно) пептид, запускаемый гибридизацией сшивающий агент, транспортный агент или запускаемый гибридизацией расщепляющий агент. Олигонуклеотиды могут быть синтезированы известными в данной области стандартными способами, например с помощью автоматического ДНК-синтезатора (такого, как поставляемый фирмой Biosearch, Applied Biosystems и т.д.). В качестве примеров фосфотиоатные олигонуклеотиды могут быть синтезированы способом Штейна (Stein et al. //Nucl. Acids Res. 1988, v. 85, p. 7448-7451), метилфосфонатные олигонуклеотиды можно приготовить с использованием носителей для полимеров из стекла с контролируемым размером пор (Sarin et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, v. 85, p. 7448-7451) и т.д. В специфическом осуществлении антисмысловой олигонуклеотид для полипептида sHASEGP включает каталитическую РНК или рибозим (см., например, международную публикацию WO 90/11364, опубликованную 4 октября 1990 г.; Sarver et al. //Science. 1990, v. 247, p. 1222-1225). В другом осуществлении олигонуклеотид представляет собой 2'-о-метилрибонуклеотид (Inoue et al. //Nucl. Acids. Res. 1987, v. 15, p. 6131-6148) или химерный РНК-ДНК аналог (Inoue et al. //FEBS Lett. 1987, v. 215, p. 327-330).

В качестве альтернативы олигонуклеотидом может быть двунитевая РНК (dsRNA), такая, как RNAi.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения антисмысловая нуклеиновая кислота для полипептида sHASEGP продуцируется внутриклеточно путём транскрипции с эндогенной последовательности нуклеотидов.

Например, вектор может быть введён in vivo таким образом, что он захватывается клеткой, внутри этой клетки вектор или его часть транскрибируется, образуя антисмысловую нуклеиновую кислоту (РНК). Такой вектор должен содержать последовательность, кодирующую антисмысловую нуклеиновую кислоту для полипептида sHASEGP. Такой вектор может оставаться эписомным или быть интегрированным в хромосому всё время, пока он может транскрибироваться, производя требуемую антисмысловую РНК. Такие векторы могут быть сконструированы с помощью стандартных для данной области методов технологии рекомбинантной ДНК. Векторами могут быть плазмиды: вирусные или иные, известные в данной области, используемые для репликации и экспрессии в клетках млекопитающих. Экспрессия последовательности, кодирующей антисмысловую РНК для полипептида sHASEGP, может запускаться любым известным в данной области промотором, работающим в клетках млекопитающих, включая клетки человека. Такие промоторы могут быть индуцибельными или конститутивными. Такие промоторы включают (но не ограничены ими) раннюю промоторную область SV40 (Bemoist and Chambon //Nature. 1981, v. 290, p. 304-310), промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Роуза

(Yamamoto et al. //Cell. 1980, v. 22, p. 787-797), промотор гена тимидин-киназы вируса герпеса (Wagner et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, v. 78, p. 1441-1445), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster et al. //Nature. 1982, v. 296, p. 39-42) и т.д.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты включают последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена полипептида sHASEGP, в том числе гена полипептида sHASEGP человека. Абсолютная комплементарность не требуется. Количество антисмысловой нуклеиновой кислоты для полипептида sHASEGP, эффективное в лечении или предотвращении опухолевого заболевания, зависит от природы заболевания и может быть определено опытным путём с помощью стандартных клинических методов.

Если это возможно, желательно перед тестированием и применением у людей определить цитотоксичность антисмысловой последовательности в клетках in vitro, а затем проверить в пригодных модельных системах на животных.

2. Интерференция РНК.

Интерференция РНК (интерферирующая РНК - RNAi) (см., например, Chuang et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, v. 97, p. 4985) может быть применена для ингибирования экспрессии гена, кодирующего sHASEGP. Фрагменты интерферирующей РНК (RNAi), в частности двунитевой (ds) RNAi, могут быть использованы для получения утраты функции sHASEGP. Известны способы, связанные с использованием RNAi для приведения генов к молчанию (выключению) в организмах, включающих млекопитающих, C. elegans, Drosophila и растения, а также людей (см., например, Fire et al. //Nature. 1998, v. 391, p. 806-811; Fire //Trends Genet. 1999, v. 15, p. 358-363; Sharp //Genes Dev. 2001, v. 15, p. 485-490; Hammond et al. //Nature Rev., Genet. 2001, v. 2, p. 110-119; Tuschl //Chem. Biochem. 2001, v. 2, p. 239-245; Hamilton et al. //Science. 1999, v. 286, p. 950-952; Hammond et al. //Nature. 2000, v. 404, p. 293-296; Zamore et al. //Cell. 2000, v. 101, p. 25-33; Bernstein et al. //Nature. 2001, v. 409, p. 363-366; Elbashir 411, p. 494-498; международная публикация WO 01/29058; международная публикация WO 99/32619).

Конструкции, экспрессирующие двунитевую РНК (dsRNA), вводят в хозяина, такого, как животное или растение, с помощью способного к репликации вектора, который остаётся в виде эписомы или интегрируется в геном. Выбирая подходящие последовательности, можно получить интерференцию экспрессии dsRNA с накоплением эндогенной мРНК, кодирующей sHASEGP. Можно также применить RNAi для ингибирования экспрессии in vitro.

Для получения RNAi используют участки, содержащие по меньшей мере около 21 (или 21) нуклеотида, селективные (т.е. уникальные) для sHASEGP. Меньшие фрагменты длиной около 21 нуклеотида можно трансформировать непосредственно в клетки (т.е. in vitro или in vivo); молекулы RNAi большей длины (dsRNA) вводят, как правило, с помощью векторов, их кодирующих. Молекулы dsRNA имеют длину по меньшей мере около 21 пары нуклеотидов (п. н.) или больше, как, например, 50, 100, 150, 200 и более п. н. Способы, реагенты и прописи для введения молекул нуклеиновой кислоты в клетки in vitro и in vivo известны специалистам в данной области.

3. Генная терапия.

В приводимом для примера осуществлении настоящего изобретения нуклеиновые кислоты, включающие последовательность нуклеотидов, кодирующую полипептид sHASEGP или его функциональные домены или производные, вводят для поддержания функции полипептида sHASEGP путём генной терапии. Генная терапия относится к терапии, осуществляемой введением индивидууму нуклеиновой кислоты. В данном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота обеспечивает продукцию кодируемого ею белка, который является посредником в терапевтическом эффекте, поддерживая функцию полипептида sHASEGP. Может быть использован любой из способов генной терапии, доступный в данной области (см. Goldspiel et al. //Clinical Pharmacy. 1993, v. 12, p. 488-505; Wu and Wu //Biotherapy. 1991, v. 3, p. 87-95; Tolstoshev //Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, v. 32, p. 573-596; Mulligan //Science. 1993, v. 260, p. 926-932; и Morgan and Anderson //Ann. Rev. Biochem. 1993, v. 62, p. 191-217; Trends in Biotechnol. 11. 1993, v. 5, p. 155-215). Например, одна из терапевтических композиций для генной терапии включает кодирующую полипептид sHASEGP нуклеиновую кислоту, которая является частью экспрессирующего вектора, экспрессирующего в подходящем хозяине полипептид sHASEGP или его домен, фрагмент или химерный белок. В частности, такая нуклеиновая кислота содержит промотор, функционально присоединённый к кодирующей области для полипептида sHASEGP, причём промотор является индуцибельным или конститутивным и, по усмотрению, тканеспецифичным. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения используется молекула нуклеиновой кислоты, в которой кодирующие полипептид sHASEGP последовательности и любые другие необходимые последовательности фланкированы участками, которые способствуют гомологичной рекомбинации в требуемом участке генома, обеспечивая таким путём внутрихромосомную экспрессию нуклеиновой кислоты для белка sHASEGP (Koller and Smithies //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, v. 86, p. 8932-8935; Zijlstra et al. //Nature. 1989, v. 342, p. 435-438).

Доставка нуклеиновой кислоты в организм пациента может быть либо прямой (в этом случае организм пациента непосредственно приводится в контакт с нуклеиновой кислотой или несущим нуклеиновую кислоту вектором), либо непрямой (в этом случае сначала клетки трансформируют нуклеиновой

кислотой in vitro, а затем пересаживают их пациенту). Эти два подхода известны, соответственно, как генная терапия in vivo или генная терапия ex vivo.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту вводят непосредственно in vivo, где она экспрессируется, давая кодируемый продукт. Это можно осуществить любым из известных в данной области многочисленных способов, например делая её частью подходящего экспрессирующего нуклеиновую кислоту вектора и вводя её так, что она становится внутриклеточной, например путём заражения дефектным или аттенуированным ретровирусным или иным вирусным вектором (см. патент США № 4980286), или путём инъекции «голой» ДНК, или путём бомбардировки микрочастицами (например, с помощью «генного ружья» фирмы Biolistic, Dupont), или покрывая нуклеиновую кислоту липидами или имеющими сродство к клеточным рецепторам или трансфицирующими агентами, путём инкапсулирования в липосомы, микрочастицы или микрокапсулы, или же вводя её связанную с пептидом, про который известно, что он проникает в ядро, или вводя её связанную с лигандом, подвергающимся опосредованному рецепторами эндоцитозу (см., например, Wu and Wu //J. Biol. Chem. 1987, v. 262, p. 4429-4432), который может быть использован для нацеливания на типы клеток, специфически экспрессирующие рецептор, и т.д. В другом варианте осуществления настоящего изобретения может быть приготовлен комплекс нуклеиновой кислоты с лигандом, в котором лигандом является способный к слиянию вирусный пептид, чтобы разрушить эндосомы, что позволит нуклеиновой кислоте избежать липосомной деструкции. Ещё в другом варианте осуществления настоящего изобретения можно обеспечить клеточно-специфичный захват нуклеиновой кислоты in vivo и её экспрессию в этих клетках путём нацеливания на специфический рецептор (см., например, международные публикации WO 92/06180, датированную 16 апреля 1992 г. (Wu et al.); WO 92/22635, датированную 23 декабря 1992 г. (Wilson et al.); WO 92/20316, датированную 26 ноября 1992 г. (Findeis et al.); WO 93/14188, датированную 22 июля 1993 г. (Clarke et al.); WO 93/20221, датированную 14 октября 1993 г. (Young)). В качестве альтернативы нуклеиновая кислота может быть введена внутрь клеток и инкорпорирована для экспрессии в ДНК клетки-хозяина путём гомологичной рекомбинации (Koller and Smithies //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, v. 86, p. 8932-8935; Zijlstra et al. //Nature. 1989, v. 342, p. 435-438).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения используют вирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту полипептида sHASEGP. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al. //Meth. Enzymol. 1993, v. 217, p. 581-599). Эти ретровирусные векторы были модифицированы, чтобы изъять ретровирусные последовательности, не являющиеся необходимыми для упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Подлежащую использованию в генной терапии нуклеиновую кислоту полипептида sHASEGP клонируют в вектор, который способствует доставке гена пациенту. Дополнительные детали, касающиеся ретровирусных векторов, можно найти в работе Boesen et al. //Biotherapy. 1994, v. 6, p. 291-302, в которой описано применение ретровирусного вектора для доставки гена mdr1 в кроветворные стволовые клетки с целью сделать стволовые клетки более устойчивыми к химиотерапии.

Другими ссылками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al. //J. Clin. Unvest. 1994, v. 93, p. 644-651; Kiem et al. //Blood. 1994, v. 83, p. 1467-1473; Salmons and Gunzberg //Human Gene Therapy. 1993, v. 4, p. 129-141; и Grossman and Wilson //Curr. Opin.in Genetics and Devel. 1993, v. 3, p. 110-114.

Другими вирусными векторами, которые могут быть применены в генной терапии, являются аденовирусы. Аденовирусы - это особенно привлекательные носители для доставки генов в эпителий дыхательных путей. Аденовирусы в природе заражают эпителий дыхательных путей, где они вызывают слабое заболевание. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, клетки эндотелия и мышцы. Преимущество аденовирусов заключается в том, что способны заражать неделящиеся клетки. В работе Kozarsky and Wilson //Curr. Opin. in Genetics and Devel. 1993, v. 3, p. 499-503 представлен обзор генной терапии на основе аденовирусов. Bout et al. //Human Gene Therapy. 1994, v. 5, p. 3-10 продемонстрировали применение аденовирусных векторов для переноса генов в эпителий дыхательных путей макак-резусов. Другие примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в работах Rosenfeld et al. //Science. 1991, v. 252, p. 431-434; Rosenfeld et al. //Cell. 1992, v. 68, p. 143-155; и Mastrangeli et al. //J. Clin. Invest. 1993, v. 91, p. 225-234.

Для применения в генной терапии был также предложен аденоассоциированный вирус (AAB) (Walsh et al. //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1993, v. 204, p. 289-300).

Другой подход к генной терапии включает перенесение гена в клетки в культуре клеток такими способами, как электропорация, липофекция, трансфекция в присутствии фосфата кальция или вирусная инфекция. Обычно способ перенесения включает перенесение в клетки селектируемого маркера. Затем клетки помещают на селективную среду, чтобы выделить те клетки, которые захватили и экспрессировали перенесённый ген. Затем эти клетки вводят пациенту.

В данном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту вводят в клетку до введения in vivo получаемой рекомбинантной клетки. Такое введение можно осуществить любым известным в данной области способом, в том числе (но не ограничиваясь ими) трансфекцией, электропорацией, микроинъекцией, инфекцией содержащим последовательности нуклеиновой кислоты вирусным

или бактериофаговым вектором, слиянием клеток, направляемым хромосомами переносом гена, направляемым микроклетками переносом гена, слиянием сферопластов и т.д. Для введения чужеродных генов в клетки в данной области существуют многочисленные способы (см., например, Loeffler and Behr //Meth. Enzymol. 1993, v. 217, p. 599-618; Cohen et al. //Meth. Enzymol. 1993, v. 217, p. 618-644; Cline //Pharmac. Ther. 1985, v. 29, p. 69-92). Эти способы могут быть использованы при условии, что необходимые связанные с развитием и физиологические функции реципиентных клеток при этом не нарушаются. Способ должен обеспечивать стабильный перенос нуклеиновой кислоты в клетку, так что нуклеиновая кислота может быть экспрессирована клеткой и, как правило, может быть унаследована и экспрессирована в клетках-потомках этой клетки.

Полученные рекомбинантные клетки можно ввести пациенту различными способами, известными в данной области. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вводят клетки эпителия, например, подкожно. В другом варианте осуществления пациенту могут быть введены рекомбинантные клетки кожи в виде кожного имплантата. Рекомбинантные клетки крови (например, кроветворные стволовые клетки или клетки-предшественники) можно ввести внутривенно. Количество клеток для предусматриваемого введения зависит от требуемого эффекта, состояния пациента и т.д. и может быть определено специалистом в данной области.

Клетки, в которые может быть введена нуклеиновая кислота для целей генной терапии, охватывают любые необходимые и доступные типы клеток и включают (но не ограничиваются ими)

клетки эпителия, клетки эндотелия, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты

клетки крови, такие как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, гранулоциты;

различные стволовые клетки или клетки-предшественники, в особенности кроветворные стволовые клетки или клетки-предшественники, например, такие как стволовые клетки, полученные из костного мозга, крови пупочного жгута, периферической крови, печени плода и других их источников.

Например, используемые для генной терапии клетки являются аутологичными для пациента. В осуществлении, где в генной терапии используются рекомбинантные клетки, нуклеиновую кислоту для полипептида sHASEGP вводят в клетки так, что она может экспрессироваться клетками или их потомством, и затем рекомбинантные клетки вводят in vivo для получения лечебного эффекта. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения используют стволовые клетки или клетки-предшественники. В соответствии с этим вариантом осуществления, потенциально могут быть использованы любые стволовые клетки или клетки-предшественники, которые могут быть выделены и поддерживаться in vitro.

Такие стволовые клетки включают (но не ограничиваются ими) кроветворные стволовые клетки (КСК), стволовые клетки тканей эпителия, таких как кожа или выстилка кишечника, клетки сердечной мышцы эмбриона, стволовые клетки печени (международная публикация WO 94/08598, датированная 28 апреля 1994 г.) и стволовые клетки нервной ткани (Stemple and Anderson //Cell. 1992, v. 71, p. 973-985).

Эпителиальные стволовые клетки (ЭСК) или кератиноциты можно получить из таких тканей, как кожа и выстилка кишечника, известными способами (Rheinwald //Meth. Cell Biol. 1980, v. 21A, p. 229). В слоистой ткани эпителия, такой как кожа, обновление происходит путём митоза стволовых клеток внутри зародышевого слоя - слоя, наиболее близкого к расположенному у основания тонкому слою. Стволовые клетки в выстилке кишечника обеспечивают высокую скорость обновления этой ткани. ЭСК или кератиноциты, полученные из кожи или выстилки кишечника пациента или донора, можно выращивать в культуре ткани (Rheinwald //Meth. Cell Biol. 1980, v. 21A, p. 229; Pittelkow and Scott //Clinic Proc. 1986, v. 61, p. 771). Если ЭСК получены от донора, может быть также применён метод подавления реакции отторжения имплантата (например, облучением, введением лекарств или антител для обеспечения умеренной иммуносупрессии).

Что касается кроветворных стволовых клеток, в данном варианте осуществления может быть использована любая техника, обеспечивающая выделение, воспроизводство и поддержание КСК in vitro. Техника, с помощью которой это может быть достигнуто, включает (a) выделение и введение в обиход культур КСК из клеток костного мозга, выделенных у будущего хозяина или у донора, или (b) использование ранее введённых в обиход культур КСК длительного поддерживания, которые могут быть аллогенными или ксеногенными.

Не аутологичные КСК обычно используют вместе с методом подавления иммунных реакций трансплантации у будущего хозяина/пациента. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетки костного мозга человека могут быть получены из заднего подвздошного гребня отсасыванием через иглу (см., например, Kodo et al. //J. Clin. Invest. 1984, v. 73, p. 1377-1384). Например, можно получить КСК в высокой степени обогащенными или в существенно чистом виде. Это обогащение может быть проведено до, в ходе или после длительного культивирования и может быть осуществлено с помощью любой известной в данной области техники. Долговременные культуры клеток костного мозга могут быть введены в обиход и поддерживаться с помощью, например, модифицированной техники культур клеток Декстера (Dexter et al. //J. Cell Physiol. 1977, v. 91 p. 335) или техники культивирования Витлока-Витте (Witlock-Witte) (Witlock and Witte //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982, v. 79, p. 3608-3612).

В конкретном осуществлении нуклеиновая кислота, подлежащая введению для целей генной терапии, включает индуцибельный промотор, функционально присоединённый к кодирующей области, так что экспрессия нуклеиновой кислоты может контролироваться путём регулирования наличия или отсутствия подходящего индуктора транскрипции.

4. Пролекарства.

Предлагается способ лечения опухолевых заболеваний. Способ осуществляется на практике введением пролекарства (предшественника лекарства), которое расщепляется в специфическом месте под действием sHASEGP с высвобождением активного лекарства или предшественника, который может превращаться в активное лекарство in vivo. При контакте с клетками, экспрессирующими активный sHASEGP, пролекарство превращается в активное лекарство. Пролекарством может быть конъюгат, содержащий активный агент, такой как противоопухолевое лекарство (как, например, цитотоксичный агент), или другой терапевтический агент (ТА), присоединённый к субстрату для адресованного расщепляющего действия sHASEGP, так что лекарство или агент в конъюгате неактивны или неспособны к вхождению в клетку, но активируются при отщеплении. Продлекарство, например, может содержать молекулу хондроитин-сульфата - обычно сравнительно короткую, содержащую менее чем приблизительно 20 дисахаридных единиц, которая каталитически расщепляется адресованным sHASEGP. Цитотоксические агенты включают (но не ограничены ими) алкилирующие агенты, антипролиферативные агенты и тубулин-связывающие агенты. Другие агенты включают лекарства из барвинка, митомицины, блеомицины и таксаны.

J. Фармацевтические композиции и способы их введения

1. Компоненты композиций.

В настоящей работе предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие активный sHASEGP. Предусматриваются также комбинации соединений, модулирующих активность полипептида sHASEGP, с другим воздействием или другим соединением для воздействия на расстройство, связанное с гиалуронидазой, с таким, как соединение, представляющее собой антитело.

Полипептид sHASEGP и второй агент могут быть упакованы как раздельные композиции для введения вместе, или последовательно, или периодически. В качестве альтернативы они могут быть выполнены как единая композиция для введения или как две композиции для введения в виде одной композиции. Комбинации могут быть упакованы как наборы.

2. Рецептуры и путь введения.

Предлагаемые в настоящей работе полипептиды sHASEGP человека и их растворимые гиалуронидазные домены могут быть составлены как фармацевтические композиции, как правило, для введения в виде однократной дозы. Концентрации полипептидов в композициях эффективны, при введении, для доставки такого количества, которое эффективно для намеченного лечения. Как правило, композиции составлены для введения в виде однократной дозы. Для того чтобы составить композицию, необходимую массовую порцию полипептида sHASEGP человека, его растворимых гиалуронидазных доменов или его смеси растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают в выбранном носителе при эффективной концентрации, такой, что подвергающееся воздействию болезненное состояние ослабляется или улучшается.

В настоящей работе предусматриваются фармацевтические носители или переносчики, пригодные для введения sHASEGP человека или его растворимых гиалуронидазных доменов, в том числе любые такие носители, известные специалистам в данной области как пригодные для конкретного способа введения.

Кроме того, рецептура может быть составлена таким образом, что полипептиды являются единственным фармацевтически активным ингредиентом в композиции, или же они могут быть в комбинации с другими активными ингредиентами. В качестве фармацевтически активных носителей могут быть также пригодны липосомные суспензии, в том числе липосомы с тканевым адресованием. Они могут быть приготовлены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Например, липосомные составы могут быть приготовлены, как описано в патенте США № 4522811.

Активный sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен включён в фармацевтически приемлемый носитель в количестве, достаточном для того, чтобы проявить у подвергающегося лечению пациента терапевтически полезное действие без нежелательных побочных эффектов. Терапевтически эффективная концентрация может быть определена опытным путём при тестировании полипептидов в известных системах испытаний in vitro и in vivo, таких как системы с использованием предложенных в настоящей работе способов анализа или системы, описанные, например, в следующих работах:

Taliani et al. II Anal. Biochem. 1996, v. 240, p. 60-67;

Filocamo et al. //J. Virology. 1997, v. 71, p. 1417-1427;

Sudo et al. //Antiviral Res. 1996, v. 32, p. 9-18;

Buffard et al. //Virology. 1995, v. 209, p. 52-59;

Bianchi et al. //Anal. Biochem. 1996, v. 237, p. 239-244;

Hamatake et al. //Intervirology. 1996, v. 39, p. 249-258;

Steinkuhler et al. //Biochem. 1998, v. 37, p. 8899-8905;

D'Souza et al. //J. Gen. Virol. 1995, v. 76, p. 1729-1736;
Takeshita et al. //Anal. Biochem. 1997, v. 247, p. 242-246;
Shimizu et al. //J. Virol. 1994, v. 68, p. 8406-8408;
Mizutani et al. //J. Virol. 1996, v. 70, p. 7219-7223;
Mizutani et al. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, v. 227, p. 822-826;
Lu et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, v. 93, p. 1412-1417;
Hahm et al. //Virology. 1996, v. 226, p. 318-326;
Ito et al. //J. Gen. Virol. 1996, v. 77, p. 1043-1054;
Mizutani et al. //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, v. 212, p. 906-911;
Cho et al. //J Virol. Meth. 1997, v. 65, p. 201-207.

Полученные в этих системах данные затем экстраполируют для определения дозировок для человека.

Как правило, рассматривается терапевтически эффективная дозировка. Вводимые количества могут быть в интервале от 0,001 до 1 мг/мл (на 1 мл объёма крови), в том числе приблизительно 0,005-0,05 мг/мл и приблизительно 0,01 мг/мл. Фармацевтические формы разовой дозировки готовят так, чтобы получить приблизительно 1-1000 мг, включая приблизительно 10-500 мг, в том числе приблизительно 25-75 мг основного активного ингредиента или комбинации основных активных ингредиентов в разовой дозе. Точную дозировку можно определить опытным путём.

В некоторых случаях предпочтительна высокая разовая доза sHASEGP человека, выраженная в единицах. Например, при внутривенном введении sHASEGP предпочтительны концентрации sHASEGP от 500 до 100000 ед./мл. Лиофилизированные композиции sHASEGP идеальны также для хранения высоких разовых доз sHASEGP. Для внутривенной доставки предусматриваются флаконы с 200000 ед. лиофилизированного sHASEGP.

Дозировки с высокой концентрацией предусматриваются также для доставки малых объёмов sHASEGP. Для растворения введённых ранее вязкоупругих веществ при хирургических операциях, в случаях катаракты и имплантации внутриглазных линз, предусматривается введение инъекцией в переднюю камеру 10-100 мкл sHASEGP с концентрацией 5000 ед./мл. Инъекции в малом объёме доз 50-200 ед./мл предусматриваются также при процедурах со стекловидным телом, таких как лечение кровоизлияний в стекловидное тело или отслоения сетчатки при диабетической ретинопатии.

Активный ингредиент может быть введён сразу весь или же он может быть разделён на несколько меньших доз для введения через различные интервалы времени. Понятно, что точная дозировка и длительность лечения зависят от подлежащего лечению заболевания и могут быть определены опытным путём на основе известных режимов испытаний или путём экстраполяции данных испытаний in vivo или in vitro. Следует отметить, что значения концентраций и дозировок также могут варьировать в зависимости от серьёзности подлежащего снятию болезненного состояния. Необходимо далее понимать, что для каждого конкретного индивидуума следует распределить во времени специфические схемы дозировок, в зависимости от индивидуальной потребности и профессионального решения лица, вводящего композиции или наблюдающего за введением композиций, и что приводимые в настоящей работе далее интервалы концентраций являются лишь примерными и не предназначаются для ограничения возможностей или применения заявляемых композиций и содержащих их комбинаций.

Фармацевтически приемлемые производные включают следующие формы: кислоты, соли, эфиры, гидраты, сольваты и пролекарства. Производное обычно выбрано так, чтобы по своим фармакокинетическим свойствам оно превосходило нейтральный человеческий sHASEGP или его растворимый гиалуронидазный домен.

Итак, один или более из заявляемых в настоящей работе полипептидов или фармацевтически приемлемых их производных в эффективных концентрациях или количествах смешивают с подходящим фармацевтическим носителем или переносчиком с образованием фармацевтических композиций для системного, поверхностного или местного введения. Полипептиды человеческого sHASEGP или их растворимые гиалуронидазные домены включают в количестве, эффективном для улучшения болезненного состояния или лечения расстройства, для которого предполагается лечение. Концентрация активного полипептида в композиции зависит от абсорбции, инактивации, скоростей выведения активного полипептида, от плана введения доз, вводимого количества, конкретной рецептуры, а также от других факторов, известных специалистам в данной области.

Терапевтические агенты для применения в заявляемых способах можно вводить любым известным специалистам в данной области способом, таким как (но не ограничиваясь ими) поверхностный, внутрисуставной, внутриполостной, внутриглазной, внутрижелудочковый, внутриоболочечный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутритрахеальный пути введения, а также любой комбинацией любых двух или более из них. Могут также быть предусмотрены композиции в виде сухих порошков для лёгочного введения.

Наиболее подходящий путь введения может изменяться в зависимости от предполагаемого применения, такого как, например, применение в качестве средства доставки для облегчения подкожной доставки жидкостей, применение для снижения внутриглазного давления в глазах пациентов с глаукомой, получающих вязкоупругие препараты, или применение в качестве «распределяющего средства» для уси-

ления активности химиотерапевтических веществ, а также в зависимости от локализации представляющей интерес мишени, такой как конкретный внутренний орган, место роста опухоли, внутриглазная полость и эпидермис. Способы введения включают (но не ограничиваются ими) поверхностный, местный, внутрисуставной, внутриполостной, внутриглазной, внутрижелудочковый, внутриоболочечный, внутривенный, внутримышечный, внутритрахеальный, внутрибрюшинный, внутрикожный, пути введения, а также любую комбинацию любых двух или более из них. Например, при лечении различных типов рака, таких как карцинома простого плоского эпителия, рак молочной железы, рак мочевого пузыря и рак желудочно-кишечного тракта, местное применение, в том числе введение в место роста опухоли (например, внутриоболочечным, внутрижелудочковым или внутриполостным путями), даёт то преимущество, что терапевтическое средство может быть введено в высокой концентрации без риска осложнений, которые могут сопровождать системное введение терапевтического средства.

Предлагаемые в настоящей работе фармацевтические и косметические носители или переносчики для введения полипептидов sHASEGP человека или их растворимого гиалуронидазного домена включают любые такие носители, известные специалистам в данной области как подходящие для конкретного способа введения. Кроме того, рецептура может быть составлена таким образом, что полипептиды являются единственным фармацевтически активным ингредиентом в композиции, или же они могут быть в комбинации с другими активными ингредиентами, не ослабляющими требуемой активности, или с материалами, дополняющими требуемую активность, известными специалистам в данной области. Например, предлагаемые в настоящей работе полипептиды sHASEGP могут быть использованы как доставляющее или «распределяющее» средство в комбинации со вторым активным соединением, таким как терапевтически эффективное средство, включающее лекарство или пролекарство (но не ограниченное ими). Это делается для облегчения доставки или для усиления активности второго активного ингредиента. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен может быть включён в рецептуру вместе с анестезирующим средством, таким как лигнокаин (Lignocaine), бупивикаин (Bupivicaine) или смесь их обоих, и, по усмотрению, с гормональным средством, таким как эпинефрин, для снижения или остановки поглощения в крови в ходе офтальмологической хирургической операции. Полипептид sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен может быть также включён в рецептуру вместе с различными химиотерапевтическими средствами, такими как токсин и фактор некроза опухолей, для усиления активности химиотерапевтического средства и/или для повышения доступности опухолей-мишеней для химиотерапевтического средства. Активное соединение включают в носитель в количестве, достаточном для проявления терапевтически полезного действия, при отсутствии серьезных токсических проявлений у подвергаемого лечению индивидуума. Эффективную концентрацию можно определить опытным путём, испытывая соединения с применением систем in vitro и in vivo, в том числе описанных в настоящей работе животных моделей.

Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного, подкожного или местного применения, могут включать любой из следующих компонентов:

стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой физиологический раствор, нелетучее масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль или иной синтетический растворитель;

антимикробные средства, такие как бензиловый спирт и метилпарабены;

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и бисульфит натрия;

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетраацетат (ЭДТА);

буферы, такие как ацетаты, цитраты и фосфаты;

средства для поддержания тонуса, включающие (но не ограниченные ими) хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид магния, декстрозу, глицерин или борную кислоту.

Препараты для парентерального введения могут быть заключены в ампулы, разовые шприцы или во флаконы для разовой дозы или нескольких доз, сделанные из стекла, пластика или другого подходящего материала.

Полипептиды sHASEGP человека или их растворимые гиалуронидазные домены могут быть суспендированы в микронизованной или другой приемлемой форме, или же могут быть приготовлены их производные для получения активного продукта с улучшенной растворимостью или для получения пролекарства. Форма получаемой смеси зависит от большого числа факторов, в том числе от намеченного способа введения и растворимости полипептида в выбранном носителе или переносчике. Эффективная концентрация достаточна для улучшения назначенного к лечению болезненного состояния и может быть определена опытным путём с помощью методов, известных специалистам в данной области.

Для составления композиции взвешенную порцию полипептида растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают с выбранным носителем при эффективной концентрации, такой, что намеченное к лечению болезненное состояние снимается или улучшается.

В тех случаях, когда растворимость полипептидов sHASEGP человека или их растворимого гиалуронидазного домена недостаточна, могут быть использованы методы растворения полипептидов. Такие методы известны специалистам в данной области и включают (но не ограничены ими) использование добавочных растворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), использование поверхностно-

активных веществ, таких как Твин (Tween®) и Плюроник (Pluronic®) F68; или растворение в водном растворе бикарбоната натрия. В составлении эффективной фармацевтической композиции могут быть также использованы производные полипептидов, такие как полипептид в форме пролекарства. Для офтальмологических назначений композиции составляют в офтальмологически приемлемом носителе. Для указанных в настоящей работе офтальмологических применений предусматривается местное введение: путём поверхностного нанесения либо путём инъекции. Желательны также композиции с постепенным высвобождением лекарства. Как правило, композиции составляют с расчётом введения однократной дозы, так что в однократной дозе вводится эффективное количество.

При смешивании с носителем или при добавлении полипептида к носителю получаемая смесь может быть раствором, суспензией, эмульсией или иной композицией и может быть составлена как водные смеси, кремы, гели, мази, эмульсии, растворы, эликсиры, лосьоны, суспензии, настойки, пасты, пенки, аэрозоли, промывания, аэрозоли (спреи), свечи, бандажи или в иной лекарственной форме, пригодной для системного, поверхностного или местного введения.

Форма полученной в результате смеси зависит от многих факторов, в том числе от намеченного способа введения и от растворимости соединения в выбранном носителе или переносчике. При необходимости готовят фармацевтически приемлемые соли или иные производные соединений. Для местного внутреннего введения, такого как внутримышечное, парентеральное или внутрисуставное введение, соединения предпочтительно вводят в композицию в виде растворённой суспензии в среде на основе воды, в такой как изотонический забуференный солевой раствор, или комбинируют с биосовместимой плёнкой или клейкой лентой, предназначенной для внутреннего введения.

Полипептид sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен включают в фармацевтически приемлемый носитель в количествах, достаточных для проявления у подвергаемого лечению пациента терапевтически полезного действия без нежелательных побочных эффектов. Понятно, что число и степень побочных эффектов зависят от болезненного состояния, для лечения которого вводят соединения. Например, при лечении угрожающего жизни заболевания можно пренебречь некоторыми токсическими и нежелательными побочными проявлениями, которые недопустимы при лечении расстройств с менее опасными последствиями. Эффективные для терапевтического применения количества зависят, конечно, от тяжести заболевания и от массы и общего состояния индивидуума, а также от пути введения. Для местного введения терапевтического средства обычно требуется меньшая дозировка, чем при любом виде системного введения, хотя локальная концентрация терапевтического средства в некоторых случаях после местного введения может быть выше, чем достигаемая без опасных последствий при системном введении.

Поскольку отдельные индивидуумы могут обнаруживать широкий спектр тяжести симптомов, а каждое терапевтическое средство имеет свои особенные терапевтические характеристики, практикующему врачу надлежит определить индивидуальную реакцию индивидуума на лекарственное воздействие и соответственно с этим варьировать дозировки. Используемые in vitro дозировки могут быть полезны в определении количеств, пригодных для введения in situ фармацевтической композиции, и в некоторых случаях для определения эффективных дозировок для лечения конкретных расстройств могут быть использованы животные модели. Как правило, однако, предполагается, что для местного введения эффективное количество терапевтического средства должно быть в интервале приблизительно 0,1 пг-1 нг на 1 кг массы тела. Различные соображения для достижения эффективного количества средства хорошо известны специалистам в данной области и приведены в литературе (см., например, Goodman and Gilman //"The Pharmacological Bases of Therapeutics", 8-е изд. Pergamon Press, 1990; Remington //"Pharmaceutical Sciences", 17-е изд. Mack Publishing Co., Easton, PA., 1990 и Mantyh et al. //Science. 1997, v. 278, p. 275-279, где проводили внутриоболочечную инъекцию нейроспецифического лиганда-токсина; каждая из ссылок включена в настоящей работе ссылкой во всей её полноте).

Предлагаемые в настоящей работе композиции с полипептидами sHASEGP человека или их растворимыми гиалуронидазными доменами включают композиции, пригодные для перорального, ректального, поверхностного, ингаляционного внутриротового (например, подъязычного), парентерального (например, подкожного, внутримышечного, внутрикожного или внутривенного), чрескожного введения или любого пути введения. В каждом данном случае наиболее пригодный путь введения зависит от природы и тяжести подлежащего лечению болезненного состояния и от природы подлежащего применению конкретного активного компонента. Для введения людям и животным композиции предлагаются в форме разовых дозировок, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные растворы или суспензии для парентерального введения, растворы или суспензии для перорального введения и водномасляные эмульсии, содержащих подходящие количества полипептидов и/или других средств или их фармацевтически приемлемых производных. Фармацевтические терапевтически активные полипептиды и/или другие средства и их производные обычно составляются и вводятся в формах разовой дозировки или в формах множественной дозировки.

Термин «форма разовой дозировки», как он использован в настоящей работе, относится к физически дискретным единицам, пригодным для человеческих и животных индивидуумов и упакованным индивидуально, как это известно в данной области.

Фармацевтические композиции предоставляются для введения людям и животным в формах разовой дозировки, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные растворы или суспензии для парентерального введения, растворы или суспензии для перорального введения и водномасляные эмульсии, содержащих подходящие количества полипептида sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена и, по усмотрению, другого средства или его фармацевтически приемлемых производных. Фармацевтические терапевтически активные соединения и их производные обычно составляются и вводятся в формах разовой дозировки или в формах множественной дозировки.

Каждая единичная доза содержит предварительно определённое количество терапевтически активного соединения, достаточное для получения желательного терапевтического эффекта, в соединении с необходимыми фармацевтическим носителем, переносчиком или разбавителем. Примеры форм разовой дозировки включают (но не ограничены ими) ампулы, шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Для примера, композиция малого объёма, содержащая стабилизированный раствор sHASEGP (от 1 до 5000 ед.) в малом объёме, таком как объём в пределах 5-50 мкл, может быть предварительно заключена в шприц для использования, например, после инъекции вязкоупругого вещества.

Формы разовой дозировки могут вводиться порциями или их кратным числом. Форма множественной дозировки представляет собой множество идентичных форм разовой дозировки, помещённых в один контейнер с назначением введения отдельными формами разовой дозировки. Примеры форм множественной дозировки включают флаконы, бутылки с таблетками или капсулами, или бутылки с жидкостью объёмом в пинты или галлоны. Таким образом, форма множественной дозировки представляет собой множество единичных доз, которые не разделены упаковкой (не упакованы раздельно).

Композиция вместе с активным ингредиентом, таким, как полипептид sHASEGP, может содержать: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, двузамещённый фосфат кальция или карбоксиметилцеллюлоза, смазывающее вещество, такое как стеарат магния, стеарат кальция и тальк, и связывающее вещество, такое как крахмал, натуральные камеди, такие как гуммиарабик, желатин, глюкоза, патоки, поливинилпирролидон, целлюлозы и их производные, повидон, кросповидоны и иные такие связывающие вещества, известные специалистам в данной области. Пригодные для фармацевтического введения жидкие композиции могут быть приготовлены, например, растворением, диспергированием или иным смешиванием активного соединения, как оно определено выше, и добавляемых по усмотрению фармацевтических адъювантов в носителе, таком как, например, вода, солевой физиологический раствор, водный раствор декстрозы, глицерин, гликоли, этанол и подобные им, чтобы таким образом получить раствор или суспензию. Если требуется, подлежащая введению фармацевтическая композиция может также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких, как увлажняющие средства, эмульгирующие средства, солюбилизирующие средства, буферные агенты для поддержания pH и подобные им - например, ацетат, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитан-монолаурат, триэтаноламин, ацетат натрия, триэтаноламин-олеат и другие подобные агенты. Способы приготовления таких дозировочных форм известны или должны быть очевидны специалистам в данной области (см., например, Remington //"Pharmaceutical Sciences". 15-е изд. Mack Publishing Company, Easton, PA, 1975). Предназначенная для введения композиция или рецептура содержит активный компонент в количестве, достаточном для ослабления болезненных симптомов у подвергающегося лечению индивидуума. Например, стандартная стабилизированная композиция с sHASEGP человека или его растворимым гиалуронидазным доменом, как она предлагается в настоящей работе, включает 150 ед./мл растворимого гликопротеина, включённого в рецептуру вместе с ЭДТА, NaCl и $CaCl_2$. В добавление к этому, в композиции может присутствовать антибактериальное или антигрибковое средство, в том числе (но не ограничиваясь им) тиомерзаль. Другая предлагаемая здесь композиция представляет собой стабилизированный раствор или лиофилизированную форму sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена в ЭДТА, NaCl и $CaCl_2$, который(ая) содержит эффективное активное количество растворимого гликопротеина (например, 150 ед./мл) с добавкой лактозы, такой как 13 мг/мл. В настоящей работе также предлагается композиция, содержащая стабилизированный раствор или лиофилизированную форму sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена в ЭДТА, NaCl и $CaCl_2$, которая содержит эффективное активное количество растворимого гликопротеина (такое как 150 ед./мл) с добавкой лактозы, такой как 13 мг/мл, а также альбумина, Плюроник F68, Твин и/или другого детергента. Другая предлагаемая в настоящей работе композиция, либо в лиофилизированной форме, либо в виде стабилизированного раствора, содержит эффективное количество sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, такое как от 1 до 300 ед./мл, в ЭДТА, NaCl и $CaCl_2$.

Могут быть приготовлены дозировочные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в количестве от 0,005 до 100% по отношению к нетоксичному носителю. Для перорального введения фармацевтическая композиция может быть форме, например, таблеток или капсул, приготовленных обычным образом с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как

связывающие агенты (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или оксипропилметилцеллюлоза);

наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или кислый фосфат кальция);

смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк или квасцы);

дезинтегрирующие средства (например, картофельный крахмал или натриевый гликолат крахмала); или увлажняющие средства (например, лаурилсульфат натрия).

Таблеткам можно придать покрытие хорошо известными в данной области методами.

Композиции с sHASEGP человека или его растворимым гиалуронидазным доменом или фармацевтически приемлемыми производными могут быть приготовлены с носителями, защищающими растворимый гликопротеин от быстрого выведения из организма. Это могут быть композиции с дозированным во времени высвобождением лекарства или покрытия. Композиции могут включать, для получения желательной комбинации свойств, другие фармацевтически эффективные средства, про которые повсеместно известно, что они полезны в лечении одного или более заболевания или медицинских болезненных состояний, в том числе (но не ограничиваясь ими): химиотерапевтическое средство, болеутоляющее средство, противовоспалительное средство, антимикробное средство, трихомоноцидное средство, средство против болезни Паркинсона, антималярийное средство, амёбоцидное средство, антидепрессантное средство, противоартритное средство, противогрибковое средство, антигипертензивное средство, антигипертермическое средство, антипаразитное средство, антигистаминное средство, средство - альфа-адренергический агонист, средство - альфа-блокатор, анестезирующее средство, бронхолитическое средство, биоцидное средство, бактерицидное средство, бактериостатическое средство, средство - бета-адренергический блокатор, средство - блокатор кальциевых каналов, сердечнососудистое средство, противозачаточное средство, деконденсирующее средство, диуретическое средство, депрессантное средство, диагностическое средство, электролитное средство, гипнотическое средство, гормональное средство, гипергликемическое средство, расслабляющее мускулы средство, сокращающее мускулы средство, офтальмологическое средство, парасимпатомиметическое средство, психомоторное (тимолептическое) средство, успокаивающее (седативное) средство, симпатомиметическое средство, антифобическое средство (транквилизатор), средство для мочевого пузыря, вагинальное средство, противовирусное средство, витаминное средство, нестероидное противовоспалительное средство, средство - ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, полипептид, белок, нуклеиновая кислота, лекарство, пролекарство, органическая молекула и снотворное вещество. Должно быть понятно, что такая комбинированная терапия составляет ещё один аспект предлагаемых в настоящей работе композиций и способов лечения.

3. Композиции для перорального введения.

Формы фармацевтических дозировок для перорального введения представляют собой твёрдое вещество, гель или жидкость. Твёрдыми дозировочными формами являются таблетки, капсулы, гранулы и объёмные порошки. Типы пероральных таблеток включают прессованные жевательные лепешки и таблетки, которые могут быть покрыты растворимой в кишечнике оболочкой, покрыты сахаром или покрыты плёнкой. Капсулами могут быть твёрдые или мягкие желатиновые капсулы, тогда как гранулы и порошки могут быть предложены в нешипучей или шипучей форме, с комбинацией других ингредиентов, известных специалистам в данной области.

Фармацевтические композиции, содержащие sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен, могут быть в жидкой форме, например в виде растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть предоставлены как лекарственный продукт, подлежащий перед применением воссозданию с помощью воды или другого подходящего носителя. Такие жидкие препараты могут быть приготовлены общепринятыми способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие агенты (например, сорбитовый сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные съедобные жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или гуммиарабик); неводные носители (например, миндальное масло, эфиры масел или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-оксибензоаты или сорбиновая кислота).

В определённых осуществлениях композиции представляют собой твёрдые дозировочные формы, предпочтительно капсулы или таблетки. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и подобные им могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений подобной природы: связующее вещество, разбавитель, дезинтегрирующее средство, смазывающее средство, облегчающее скольжение вещество, подслащивающее средство и ароматизирующее средство.

Примеры связующих веществ включают микрокристаллическую целлюлозу, камедь траканта, раствор глюкозы, гуммиарабик акации, раствор желатина, сахарозу и пасту крахмала. Смазывающие вещества включают тальк, крахмал, магнезию или стеарат кальция, ликоподий и стеариновую кислоту. Разбавители включают, например, лактозу, сахарозу, крахмал, каолин, соль, маннитол и двузамещённый фосфат кальция. Облегчающие скольжение вещества включают (но не ограничены ею) коллоидную двуокись кремния. Дезинтегрирующие агенты включают натриевую соль кросскармелозы, натрий-гликолат крахмала, альгиновую кислоту, пшеничный крахмал, картофельный крахмал, бентонит, метилцеллюлозу, агар и карбоксиметилцеллюлозу. Окрашивающие агенты включают, например, любой из разрешённых сертифицированных водорастворимых красителей FD и C, их смеси и водонерастворимые красители FD и C, суспендированные на гидроокиси алюминия. Подслащивающие агенты включают сахарозу, лактозу, маннитол, искусственные подслащивающие агенты, такие как сахарин, и любое число высушенных распылительной сушкой ароматизаторов. Ароматизирующие вещества включают природные ароматизаторы, экстрагированные из растений, такие как ароматизаторы из фруктов, и синтетические смеси соеди-

нений, придающих приятное ощущение, таких как мятное масло и метилсалицилат. Увлажняющие вещества включают пропиленгликоль-моностеарат, сорбитан-моноолеат, диэтиленгликоль-монолаурат и лауриловый эфир полиоксиэтилена. Покрытия растворимой в кишечнике оболочки включают жирные кислоты, жиры, воски, шеллак, насыщенный аммиаком шеллак и фталаты ацетата целлюлозы. Плёночные покрытия включают оксиэтилцеллюлозу, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоль 4000 и фталат ацетата целлюлозы.

Если желательно пероральное введение, sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен могут быть предоставлены в композиции, которая защищает их от кислой среды желудка. Например, композиция может быть заключена в растворимую в кишечнике оболочку, которая обеспечивает её целостность в желудке и высвобождает активное соединение в кишечнике. Композиция может быть также составлена в комбинации с антацидом или другим подобным ингредиентом.

Если форма разовой дозировки является капсулой, она может, кроме материала указанных выше типов, содержать жидкий носитель, такой как жирное масло. Кроме того, формы разовой дозировки могут содержать различные другие материалы, модифицирующие физическую форму дозировочной единицы. Например, они могут быть покрыты сахаром или другими растворимыми в кишечнике веществами. Композиции могут также вводиться как компоненты эликсира, суспензии, сиропа, облатки, разбрызгиваемой формы, жевательной резинки и тому подобного. Сироп может содержать, в добавление к активным соединениям, сахарозу в качестве подслащивающего агента и некоторые консерванты, красители и окрашивающие вещества, и ароматизаторы.

sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен могут быть также смешаны с другими активными материалами, не снижающими требуемого действия, или с материалами, которые дополняют требуемое действия, с такими как антациды, блокаторы H2 и диуретики. Активный ингредиент представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемое производное, как они описаны выше. Могут быть использованы более высокие концентрации активного ингредиента, до 98% по массе.

Включёнными в таблетки фармацевтически приемлемыми носителями являются связующие вещества, смазки, разбавители, дезинтегрирующие вещества, окрашивающие вещества, ароматизирующие вещества и увлажняющие вещества. Имеющие растворимое в кишечнике покрытие таблетки, благодаря этому покрытию, устойчивы к действию кислоты кишечника и растворяются или дезинтегрируются в нейтральной или щелочной среде кишечника. Покрытые сахаром таблетки - это спрессованные таблетки, на которые нанесены различные слои фармацевтически приемлемых веществ. Покрытые плёнкой таблетки - это спрессованные таблетки, покрытые полимером или другим подходящим покрытием. Множественно спрессованные таблетки - это спрессованные таблетки, полученные более чем одним циклом прессования с использованием ранее упомянутых фармацевтически приемлемых веществ. В указанных выше формах дозировки могут быть также использованы окрашивающие вещества. В спрессованных, покрытых сахаром, многократно спрессованных и жевательных таблетках используются ароматизирующие и подслащивающие вещества. Ароматизирующие и подслащивающие вещества особенно полезны при получении жевательных таблеток и лепёшек.

Жидкие формы дозировки для перорального применения включают водные растворы, эмульсии, суспензии, растворы и/или суспензии, реконструированные из нешипучих гранул, и шипучие препараты, реконструированные из шипучих гранул. Водные растворы включают, например, эликсиры и сиропы. Эмульсии бывают типа вода-в-масле или типа масло-в-воде.

Эликсиры - это прозрачные, подслащенные водно-спиртовые препараты. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эликсирах, включают растворители. Сиропы - это концентрированные растворы сахара, например сахарозы, они могут содержать консерванты. Эмульсия - это двухфазная система, в которой одна жидкость диспергирована в виде мелких капель в толще другой жидкости. Используемые в эмульсиях фармацевтически приемлемые носители - это не водные жидкости, эмульгирующие вещества и консерванты. В суспензиях используют фармацевтически приемлемые суспендирующие вещества и консерванты. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в нешипучих гранулах, подлежащих реконструированию в жидкую форму дозировки для перорального применения, включают разбавители, подслащивающие и увлажняющие вещества. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в шипучих гранулах, подлежащих реконструированию в жидкую форму дозировки для перорального применения, включают органические кислоты и источник двуокиси углерода. Во всех из перечисленных выше форм дозировки используют окрашивающие и ароматизирующие вещества.

Растворители включают глицерин, сорбитол, этиловый спирт и сироп. Примеры консервантов включают глицерин, метил- и пропилпарабен, бензойную кислоту, бензоат натрия и спирт. Примерами неводных жидкостей, используемых в эмульсиях, являются минеральное масло и масло семян хлопчатника. Примеры эмульгирующих веществ включают желатин, камедь акации, камедь трагаканта, бентонит и поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтилен-сорбитанмоноолеат. Суспендирующие агенты включают натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, пектин, камедь трагаканта и акации, вигум. Разбавители включают лактозу и сахарозу. Подслащивающие вещества включают сахарозу, сиропы, глицерин и искусственные подслащивающие вещества, такие как сахарин. Увлажняющие вещества включают пропиленгликоль-моностеарат, сорбитан-моноолеат, диэтиленгликоль-монолаурат и лаурило-

вый эфир полиоксиэтилена. Органические добавки включают лимонную кислоту и винную кислоту. Источники двуокиси углерода включают бикарбонат натрия и карбонат натрия. Окрашивающие вещества включают любой из разрешённых сертифицированных водорастворимых красителей FD и C и их смеси. Ароматизирующие вещества включают природные ароматизаторы, экстрагированные из растений, такие как ароматизаторы из фруктов, и синтетические смеси соединений, придающих приятное вкусовое ощущение.

Для получения твёрдой дозировочной формы раствор или суспензию в приводимых для примера пропиленкарбонате, растительных маслах или триглицеридах инкапсулируют в желатиновую капсулу. Такие растворы, а также их приготовление и инкапсулирование раскрыты в патентах США № 4328245, 4409239 и 4410545. Для получения жидкой дозировочной формы раствор (например, в полиэтиленгликоле) может быть разбавлен в достаточном количестве фармацевтически приемлемого жидкого носителя, например воды, чтобы его было легко отмеривать для введения.

В качестве альтернативы жидкие или полутвёрдые композиции для перорального введения могут быть приготовлены растворением или диспергированием sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена в растительных маслах, гликолях, триглицеридах, эфирах пропиленгликоля (например, пропиленкарбонате) и других подобных носителях и инкапсулированием этих растворов или суспензий в оболочки жёстких или мягких желатиновых капсул. Другие полезные композиции включают таковые, представленные далее в патентах США № 4328819 и 4358603.

Композиции, подходящие для защёчного (подъязычного) введения включают, например, лепёшки, содержащие sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен в ароматизированной основе, обычно сахарозе и камеди акации или трагаканта, и пастилки, содержащие соединение на инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и камедь акации.

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения композиции в виде таблеток и капсул могут иметь покрытие, как это известно специалистам в данной области, чтобы модифицировать или задержать растворение активного ингредиента. Так, например, они могут быть покрыты обычным перевариваемым в кишечнике покрытием, таким как фенилсалицилат, воски и фталат ацетата целлюлозы.

4. Растворы и эмульсии, предназначенные для инъекций.

В настоящей работе предусматривается также парентеральное введение sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, в основном характеризуемое инъекцией: подкожной, внутримышечной или внутривенной. Инъецируемые композиции могут быть приготовлены в обычных формах - в виде либо жидких растворов, либо суспензий; в виде твёрдых форм, пригодных для растворения перед инъекцией, или суспензий в жидкости, получаемых перед инъекцией; или в виде эмульсий. Подходящие наполнители - это, например, вода, солевой физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, по желанию, подлежащая введению фармацевтическая композиция может также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие вещества, буферные вещества для поддержания pH, стабилизаторы, усилители растворимости и другие подобные вещества, такие как, например, ацетат натрия, сорбитан-монолаурат, триэтаноламин-олеат и циклодекстрины. В настоящей работе рассматривается также имплантация систем с медленным высвобождением или с непрерывным высвобождением, обеспечивающих поддержание постоянного уровня дозировки (см., например, патент США № 3710795). Процентное содержание sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена в таких композициях для парентерального введения зависит от их конкретной природы, а также от активности соединения и потребностей индивидуума.

Парентеральное введение композиций включает внутривенное, подкожное и внутримышечное введения. Препараты для парентерального введения включают готовые к инъекции стерильные растворы, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к объединению непосредственно перед использованием с растворителем или стерильным раствором, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к объединению непосредственно перед использованием с переносчиком, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть либо водными, либо не водными.

В случае внтривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор или забуференный фосфатом солевой раствор (PBS) и растворы, содержащие загущающие и растворяющие вещества, такие как глюкозу, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их смеси.

Используемые в препаратах для парентерального введения фармацевтически приемлемые носители включают водные переносчики, неводные переносчики, антимикробные средства, изотонические вещества, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие вещества, эмульгирующие вещества, изолирующие или хелатирующие вещества и другие фармацевтически приемлемые вещества.

Примеры водных переносчиков включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера с декстрозой и лактозой для инъекций. Неводные переносчики для парентерального введения включают нелетучие масла растительного происхождения, масло семян хлопчатника, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. К препаратам для парентерального введения, упакованным в контейнеры для множественной дозировки, следует добавлять антимикробные средства бактериостатического или фун-

гистатического действия, которые включают фенолы или крезолы, ртутные препараты, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-оксибензойной кислоты, тиомерзаль, бензалконий-хлорид и бензетоний-хлорид. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфит натрия. Местные анестетики включают прокаин-гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие вещества включают натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, оксипропил-метилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие вещества включают Полисорбат 80 (Tween® 80). Изолирующее ионы металлов или образующее с ними хелатные связи вещество включает ЭДТА. Фармацевтические носители включают также этиловый спирт, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль для смешивающихся с водой переносчиков и гидроокись натрия, соляную, лимонную или молочную кислоты для установления pH.

Концентрацию фармацевтически активного соединения устанавливают таким образом, что инъекция обеспечивает его эффективное количество для получения требуемого фармакологического эффекта. Точная доза зависит, как это известно в данной области, от возраста, массы и состояния пациента или животного.

Однократные дозировки препаратов для парентерального введения упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и практикуется в данной области.

В качестве иллюстрации эффективным способом введения является внутривенное или внутриартериальное вливание стерильного водного раствора, содержащего активное соединение. Другим вариантом осуществления является стерильный водный или масляный раствор или суспензия, содержащие активное соединение, инъецируемые так, как необходимо для получения требуемого фармакологического эффекта.

Инъецируемые препараты предназначаются для местного и системного введения. Как правило, терапевтически эффективная дозировка составляется таким образом, чтобы она содержала, по меньшей мере приблизительно от 0,1 до приблизительно 90 мас.% или более предпочтительно более 1% соотношения по массе активного ингредиента к подвергаемой воздействию ткани. Активный ингредиент, такой как sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен, может быть введён однократно или же может быть разделён на некоторое число меньших доз для введения их через интервалы времени. Понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения зависят от подлежащей воздействию ткани и могут быть определены экспериментальным путём с помощью известных протоколов испытаний или путём экстраполяции данных испытаний in vivo или in vitro. Следует отметить, что величины концентраций и дозировок могут также зависеть от возраста подвергаемого лечению индивидуума. Далее необходимо понимать, что для каждого конкретного индивидуума конкретные схемы приёма лекарства должны со временем корректироваться в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональной квалификацией лица, назначающего или контролирующего введение композиций, и что приведённые в настоящей работе далее диапазоны концентраций являются лишь примерными и не предназначены ограничить границы возможностей или практическое осуществление заявляемых композиций.

Предлагаемые в настоящей работе соединения могут быть составлены для парентерального введения путём инъекции, например, разовой инъекцией ударной дозы или непрерывным вливанием. Композиции для инъекции могут быть представлены в форме разовых дозировок (например, в ампулах) или в многодозовых контейнерах с добавлением консерванта. Композиции могут быть суспензиями, растворами или эмульсиями в масляных или водных носителях и могут содержать способствующие составлению композиции вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В качестве альтернативы активный ингредиент может быть в форме порошка, подлежащего перед применением растворению в подходящем носителе, например стерильной апирогенной водой или другими растворителями. Например, в настоящей работе предлагаются для парентерального введения композиции, содержащие эффективное количество sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, такое как от 500 до 500000 ед., в виде стабилизированного раствора или в лиофилизированной форме.

Соединение может быть суспендировано в микронизованной или иной подходящей форме, или может быть получено его производное для создания более растворимого активного продукта или для создания пролекарства. Форма итоговой смеси зависит от многих факторов, включая предполагаемую форму введения и растворимость соединения в выбранном носителе или переносчике. Эффективная концентрация достаточна для ослабления симптомов болезненного состояния и может быть определена опытным путём.

5. Лиофилизированные порошки.

В настоящей работе предлагаются также лиофилизированные порошки, содержащие sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен, которые могут быть для введения воссозданы как растворы, эмульсии или другие смеси. Эти композиции могут быть также воссозданы как твёрдые вещества или гели.

Стерильный лиофилизированный порошок готовят растворением твёрдой порции sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена или смешиванием аликвоты раствора, содержащего

sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать наполнитель, повышающий стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или воссозданного раствора, приготовленного из порошка. Наполнители, которые могут быть использованы, включают (но не ограничены ими) декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу, лактозу или иное подходящее вещество. Растворитель может также содержать буфер, такой как цитратный или калий-фосфатный, или иной подобный буфер с pH вблизи нейтрального, известный специалистам в данной области. Затем стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дают лиофилизированную композицию. Как правило, получаемый после стерильной фильтрации раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон может содержать единичную дозу соединения, такую как 10-1000 или 100-500 мг, или множество доз.

Вкратце, лиофилизированный порошок готовят, растворяя декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу, лактозу или иное подходящее вещество, в количестве приблизительно 1-20%, в подходящем буфере, таком как цитратный или калий-фосфатный, или иной подобный буфер с pH вблизи нейтрального, известный специалистам в данной области. Затем к полученной смеси при температуре выше комнатной (такой как приблизительно 30-35°C) добавляют выбранную соль, такую как, например, натриевую соль sHASEGP (около 1 г соли на 1-100 г буферного раствора, обычно около 1 г соли на 30 г раствора) и перемешивают до растворения. Полученную смесь разбавляют добавлением буфера, чтобы снизить получаемую концентрацию соли приблизительно на 10-50%, обычно приблизительно на 15-25%. Полученную смесь подвергают стерильной фильтрации или обрабатывают для удаления частиц и обеспечения стерильности, после чего распределяют по флаконам для лиофилизации. Лиофилизированный порошок можно хранить при подходящих условиях, таких как температура от приблизительно 4°C до комнатной.

Воспроизведение этого лиофилизированного порошка с водой для инъекции даёт композицию для использования в парентеральном введении. Для воссоздания добавляют терапевтически эффективное количество (в расчёте на 1 мл воды или иного подходящего носителя) лиофилизированного порошка, содержащего sHASEGP человека или его растворимый гиалуронидазный домен. Точное количество зависит от выбранного соединения и может быть определено опытным путём с помощью способов, известным специалистам в данной области.

6. Местное применение.

Смеси для местного применения готовят так, как описано для местного и системного применения. Получаемые смеси могут быть растворами, суспензиями, эмульсиями или тому подобным и входят в рецептуры в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пенок, аэрозолей, обмываний, спреев, свечей, бандажей, кожных наклеек (пластырей) или в виде любых других рецептур, пригодных для местного применения.

Композиции с sHASEGP человека, или его растворимым гиалуронидазным доменом, или с его фармацевтически приемлемыми производными могут быть составлены как аэрозоли для местного применения, такого как ингаляция (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, полезные для лечения воспалительных заболеваний, в особенности астмы). Эти композиции для введения в респираторный тракт могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя, или в виде микродисперсного порошка для вдувания: либо сами по себе, либо в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В этом случае частицы композиции обычно имеют диаметр менее 50 мкм, такой как менее 10 мкм.

Для введения ингаляцией предназначенные в настоящей работе для использования композиции могут доставляться в форме аэрозольного спрея, вносимого из герметизированных упаковок или из распылителя с использованием подходящего движущего вещества, включающего (но не ограниченного ими) дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, двуокись углерода и другие подходящие газы. В случае аэрозоля из герметичной упаковки можно определить единичную дозировку, снабжая ёмкость вентилем для введения отмеренного количества. Капсулы и патроны из, например, желатина для использования в ингаляторе или вдувателе могут содержать порошковую смесь соединения из подходящей порошковой основы, такой, как лактоза или крахмал.

Композиции могут быть составлены для местного или поверхностного применения, такого, как поверхностное нанесение на кожу и слизистые оболочки (такие, как слизистая оболочка глаза), в форме гелей, кремов и лосьонов и для внесения в глаза, и для внутриполостного введения, и для введения в спинно-мозговой канал. Поверхностное применение предусматривается в случае чрескожного введения, а также для введения в глаза или в слизистую оболочку либо для ингаляционной терапии. Растворы могут также вводиться интраназально и содержать только активное соединение или его комбинацию с другими фармацевтически приемлемыми наполнителями.

Например, композиции, пригодные для поверхностного нанесения на кожу или в глаза, могут быть составлены в виде мази, крема, лосьона, пасты, геля, спрея, аэрозоля и масла. Носители, которые могут быть использованы, включают вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, спирты и комбинации двух или

более из них. Композиции для поверхностного применения могут дополнительно содержать полезные добавки от 0,05 до 15 мас.% загустителей, включая (но не ограничиваясь ими) оксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, поли(алкиленгликоли), поли/оксиалкил, (мет)акрилаты или поли(мет)акриламиды. При местном применении композицию часто вводят в виде обмываний или мази в конъюнктивальный мешок. Её также можно использовать для орошения или смазывания глаз, лицевых полостей и внешнего слухового прохода. Композиции для поверхностного применения в жидкой форме могут также присутствовать в трёхмерной матрице гидрофобного полимера в форме полосок, контактных линз и подобных им, откуда высвобождаются активные компоненты. Их можно также вводить инъекцией в переднюю камеру глаза и в другие места. Например, в настоящей работе предлагается композиция для внутриглазного применения после инъекции вязкоупругого вещества, содержащая стабилизированный раствор эффективного количества sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, такого как от 1 до 5000 ед. растворимого гликопротеина с удельной активностью от 30 до 150 000 ед./мг, в малом объёме, таком как от 5 до 50 мкл.

Эти растворы, особенно те, которые предназначены для офтальмологического применения, могут быть составлены в виде 0,01-10% изотонических растворов, pH приблизительно 5-7 с добавлением подходящих солей.

7. Композиции для других путей введения.

В настоящей работе рассматриваются также другие пути введения, такие как поверхностное нанесение, чрескожные пластыри и ректальное введение.

Например, формы фармацевтической дозировки для ректального введения - это ректальные свечи, капсулы и таблетки для системного действия.

Термин «ректальные свечи», как он использован в настоящей работе, означает твёрдые тела для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или более из фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных свечах, - это основания или носители и агенты для повышения точки плавления. Примеры оснований включают масло какао, глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтиленгликоль) и подходящие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Могут быть использованы комбинации разных оснований, вещества для повышения точки плавления свечей включают спермацет и воск. Ректальные свечи могут быть приготовлены либо способом прессования, либо способом отливки. Типичная масса ректальной свечи составляет примерно от 2 до 3 г.

Таблетки и капсулы для ректального введения производят с использованием таких же фармацевтически приемлемых веществ и теми же способами, как и для композиций для перорального введения.

Композиции, пригодные для чрескожного введения, могут быть представлены как дискретные наклейки, приспособленные для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Такие наклейки, соответственно, содержат активное соединение как забуференный, по желанию, водный раствор с концентрацией активного соединения, например, от 0,1 до 0,2 М. Пригодные для чрескожного введения композиции могут быть также введены ионофорезом (см., например, Pharmaceutical Research. 1986, v. 3, № 6, p. 318) и обычно имеют форму забуференного (по усмотрению) водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции можно также вводить с помощью средств для контролируемого высвобождения и/или приёмов доставки (см., например, в патентах США № 3536809, 3598123, 3630200, 3845770, 3847770, 3916899, 4008719, 4687610, 4769027, 5059595, 5073543, 5120548, 5354566, 5591767, 5639476, 5674533 и 5733566). Активные соединения или фармацевтически приемлемые производные могут быть приготовлены с носителями, защищающими соединение от быстрого выведения из организма. Так, это могут быть композиции с заданным временем высвобождения или с покрытиями.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагаемых в настоящей работе композиций и способов терапевтическое средство вводят местно в переносчике для доставки с медленным высвобождением, например инкапсулированным в коллоидной дисперсной системе или в стабилизированных полимерами кристаллах. Пригодные коллоидные дисперсные системы включают нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии типа масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Например, коллоидной дисперсной системой могут быть липосомы или микросферы. Липосомы - это искусственные мембранные везикулы, полезные как средства доставки с медленным высвобождением при их инъекции или имплантации. Некоторые примеры липид-полимерных конъюгатов и липосом раскрыты в патенте США № 5631018, который полностью включён в настоящую работу ссылкой. Другими примерами средств доставки с медленным высвобождением являются биодеструктируемые гидрогелевые матриксы (патент США № 5041292), конъюгаты с дендритными полимерами (патент США № 5714166) и многопузырчатые липосомы (Depofoam® фирмы Depoteh, San Diego, CA) (патенты США №№ 5723147 и 5766627). Одним из типов микросфер, пригодных для инкапсулирования терапевтических агентов для местного введения (например, в подкожную ткань), являются микросферы из поли(D,L)лактида, описанные в работе Fletcher D. //Anesth. Analg. 1977, v. 84, p. 90-94. Например, для различных применений или для лечения различных болезненных состояний (в том числе, но не ограничиваясь этими примерами, для косметических композиций или для лечения повреждений

спинного мозга) может быть использована композиция с медленным высвобождением, содержащая эффективное количество sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, такое как 1-5000 ед./мл.

Необходимые уровни содержания в крови можно поддерживать постоянным вливанием активного агента с проверкой уровней содержания в плазме. Следует отметить, что лечащий врач будет знать, как и когда завершить, прервать или снизить дозу лекарства из-за его токсичности или из-за дисфункций в спинном мозге, печени или почках. Наоборот, лечащий врач будет знать, как и когда повысить дозировку лечебного средства, если не достигнут адекватный клинический эффект (но с предотвращением токсических побочных эффектов).

Эффективность и/или токсичность полипептида sHASEGP и/или его ингибитора (ингибиторов), одного или в комбинации с другими средствами, такими как терапевтически эффективные средства, также можно оценить с помощью методов, известных в данной области (см., например, O'Reilly //Investigational New Drugs. 1997, v. 15, p. 5-13).

8. Изделия промышленного производства.

Полипептиды sHASEGP человека, или их растворимые гиалуронидазные домены, или содержащие любые из упомянутых выше агентов композиции могут быть упакованы как изделия промышленного производства, содержащие упаковочный материал, находящееся внутри упаковочного материала предложенное в настоящей работе соединение или его пригодное производное, которые эффективны для лечения рассмотренных в настоящей работе заболеваний или расстройств, и маркировку, которая указывает, что соединение или его пригодное производное предназначены для лечения рассмотренных в настоящей работе заболеваний или расстройств. По усмотрению маркировка может содержать перечисление расстройств, для которых разрешена эта терапия.

Предлагаемые в настоящей работе изделия промышленного производства содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы, используемые для упаковки фармацевтических продуктов, хорошо известны специалистам в данной области (см., например, патенты США № 5323907, 5052558 и 5033352). Примеры упаковочных материалов для фармацевтики включают (но не ограничены ими) пузырчатые упаковки (блистеры), бутылочки, тюбики, ингаляторы, нагнетатели, мешки, флаконы, контейнеры, шприцы, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранной композиции и выбранного способа введения и лечения. Предусматривается широкий набор предлагаемых в настоящей работе соединений и композиций, поскольку существуют различные способы лечения любого расстройства, в котором участвует в качестве посредника или участника в развитии симптомов или причины инфекция вирусом гепатита С (HCV).

В настоящей работе предлагаются также комплекты, содержащие композиции и/или наборы вместе с инструкциями по их применению. Комплект может дополнительно включать иглу или шприц, обычно упакованные в стерильном виде, для инъекции комплекса и/или упакованную подушечку со спиртом. По усмотрению вкладываются инструкции для врача или пациента по введению активного средства. Например, в настоящей работе предлагается комплект, содержащий шприц небольшого объёма с эффективным количеством sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, таким, как от 1 до 5000 ед. растворимого гликопротеина, в объёме от 5 до 50 мкл; по усмотрению комплект содержит второй шприц с вязкоупругим веществом. В настоящей работе предлагается также комплект, содержащий шприц небольшого объёма с эффективным количеством sHASEGP человека или его растворимого гиалуронидазного домена, таким как от 1 до 500 ед. растворимого гликопротеина, и терапевтическое количество второго активного ингредиента, такого как лекарство, небольшая молекула, белок или нуклеиновая кислота.

K. Животные модели

В настоящей работе предлагаются модели трансгенных животных и животные, такие как грызуны (в том числе мыши и крысы), коровы, куры, свиньи, козы, овцы, обезьяны (в том числе гориллы) и другие приматы. В частности, предлагаются трансгенные животные (не люди), содержащие гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид sHASEGP, или трансгенное животное, у которого экспрессия полипептида была изменена, например, путём замены или модификации промоторной области или другой регуляторной области эндогенного гена. Такое животное может быть получено путём рекомбинации (акта гомологичной или иной рекомбинации) между эндогенной нуклеиновой кислотой и экзогенным геном sHASEGP, который может быть сверхэкспрессирован или недоэкспрессирован как в случае экспрессии под сильным промотором.

Трансгенных животных можно получить введением нуклеиновой кислоты с помощью любого известного способа доставки, в том числе (но не ограничиваясь ими) с помощью микроинъекции, липофекции и других способов доставки гена в половые или соматические клетки, такие как стволовые клетки эмбриона. Как правило, нуклеиновую кислоту вводят в клетку, такую как стволовую клетку эмбриона (СКЭ), с последующей инъекцией СКЭ в бластоцисту и имплантированием бластоцисты суррогатной матери, после чего рождается трансгенное животное. Вообще введение молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты в хромосому животного происходит вследствие рекомбинации между гетерологичной нуклеиновой кислотой, кодирующей sHASEGP, и эндогенной нуклеиновой кислотой. Гетерологичная

нуклеиновая кислота может быть адресованно нацелена на определённую хромосому. В некоторых случаях могут быть получены животные с нокаутом гена (нокаутированные животные). Такое животное может быть вначале получено с помощью гомологичной рекомбинации между геном полипептида sHASEGP в его хромосоме и эндогенным геном полипептида sHASEGP, который был сделан биологически неактивным (обычно путём вставки гетерологичной последовательности, например, гена устойчивости к антибиотику). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения такую гомологичную рекомбинацию осуществляют, трансформируя полученные из эмбриона стволовые клетки вектором, содержащим инактивированный вставкой ген полипептида sHASEGP, так что происходит гомологичная рекомбинация. После этого производят инъекцию СКЭ в бластоцисту и имплантируют бластоцисту суррогатной матери. В итоге рождается химерное животное (нокаутированное животное), у которого ген полипептида sHASEGP был инактивирован (см. Capecci //Science. 1989, v. 244, p. 1288-1292). Химерное животное можно размножить, чтобы получить гомозиготных нокаутированных животных, которых дальше можно использовать для получения дополнительных нокаутированных животных. Нокаутированные животные включают (но не ограничены ими) мышей, хомячков, овец, свиней, коров и других животных, не являющихся людьми. Например, получают нокаутированную мышь. Полученных животных, проявляющих подавленную экспрессию полипептида sHASEGP, можно использовать в качестве моделей специфических заболеваний, таких как рак. Таких нокаутированных животных можно использовать как животные модели таких заболеваний, например, для поиска (скрининга) или испытания молекул на способность лечить или предотвращать такие заболевания или расстройства.

Могут быть получены также другие типы трансгенных животных, в том числе таких, у которых полипептид sHASEGP сверхэкспрессируется. Такие животные включают «нокаутированных» животных, которые представляют собой животных, у которых нормальный ген замещён вариантом, таким как мутантный ген, его сверхэкспрессируемая форма или иная форма. Например, эндогенный ген одного вида, такого как грызуны, может быть замещён геном из другого вида, такого, как человек. Можно также получить животных с помощью негомологичной рекомбинации в других сайтах хромосомы, в том числе животных, у которых произошло множество интеграционных событий.

После получения трансгенного животного первого поколения химерное животное можно размножить, чтобы получить дополнительных животных со сверхэкспрессией или с подавленной экспрессией полипептида sHASEGP. Такие животные включают (но не ограничены ими) мышей, хомячков, овец, свиней, коров и других животных, не являющихся людьми. Таких животных, проявляющих сверхэкспрессию или подавленную экспрессию полипептида sHASEGP, можно использовать в качестве моделей специфических заболеваний, таких как рак. Таких животных можно использовать как животные модели таких заболеваний, например, для поиска (скрининга) или испытания молекул на способность лечить или предотвращать такие заболевания или расстройства. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения получают мышь со сверхэкспрессией или подавленной экспрессией полипептида sHASEGP.

Следующие примеры приведены только для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения области охвата изобретения.

L. Терапевтические применения sHASEGP

В течение более 40 лет скотобойни являются основным источником ферментных препаратов для клинического применения. Основной источник этого материала - яички быков и баранов. Однако эти клинические ферментные препараты очень плохо очищены, степень чистоты продаваемых препаратов составляет 0,5-5% (оценка на основании известных значений удельной активности от 30 до 100000 ед./мг). Низкая степень чистоты, вместе с происхождением из скотобоен, делает эти препараты иммуногенными для человека, вдобавок они могут быть потенциальной причиной болезни Крейтцфельда-Якоба и источником других коровьих и овечьих патогенов. Известно, что препараты гиалуронидазы быков и баранов дают анафилактические реакции.

Гиалуронидазу крупного рогатого скота или полученную из бактерий гиалуронидазу применяли для лечения заболеваний, связанных с избытком гиалуроновой кислоты, и для усиления циркуляции физиологических жидкостей и/или терапевтических агентов. Например, бычью гиалуронидазу можно вводить инъекцией в перибульбарный, ретробульбарный и подсухожильный отделы совместно с процедурами офтальмохирургии. Кроме того, без такого введения повышается частота хирургических осложнений (Brown S.M. et al. //J. Cataract Refract. Surg. 1999, v. 25, 9, p. 1245-1249). Бычью гиалуронидазу применяют также как антидот в локальных некрозах после вневенозной инъекции некротических веществ, таких как алкалоидов барвинка (Few B.J. //Amer. J. Matern. Child Nurs. 1987, v. 12, p. 23-26). Гиалуронидаза из бычьих тестикул полезна также для лечения кист запястья (Paul et al. //J. Hand Surg. 1997, v. 22, 2, p. 219-221). Гиалуронидазу можно также использовать для облегчения подкожной доставки жидкостей при гиподермоклизе (Berger B.Y. //Am. Geriatr. Soc. 1984, v. 32, 3, p. 199-201). Можно также применять гиалуронидазу для снижения внутриглазного давления у пациентов с глаукомой и катарактой, получавших вязкоупругие вещества (патент США № 4820516, опубликован 11 апреля 1989 г.).

Гиалуронидазу крупного рогатого скота или полученную из бактерий гиалуронидазу применяли также как «распределяющее средство» для усиления активности химиотерапевтических веществ и/или повышения активности опухолей к химиотерапевтическим веществам (Schuller et al. //Proc. Amer. Assoc.

Cancer Res. 1991, v. 32, p. 173, тезис № 1034; Czejka et al. //Pharmazie. 1990, v. 45, p. H.9). Комбинационная терапия вместе с гиалуронидазой эффективна в лечении многих типов рака, включая рак мочевого пузыря (Horn et al. //J. Surg. Oncol. 1985, v. 28, p. 304-307), карциному клеток плоского эпителия (Kohno et al. //J. Cancer Res. Oncol. 1994, v. 120, p. 293-297), рак молочной железы (Beckenlehner et al. //J. Cancer Res. Oncol. 1992, v. 118, p. 591-596) и рак желудочно-кишечного тракта (Scheithauer et al. //Anticancer Res. 1988, v. 8, p. 391-396). Гиалуронидаза эффективна как единственное терапевтическое средство в лечении рака мозга (глиом) (международная публикация WO 88/02261, опубликована 7 апреля 1988 г.). Введение гиалуронидазы также индуцирует чувствительность до этого устойчивых к химиотерапии опухолей поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, яичников и молочной железы (Baumgartner et al. //Reg. Cancer Treat. 1988, v. 1, p. 55-58; Zanker et al. //Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1986, v. 27, p. 390). К сожалению, примеси и нечеловеческая природа таких гиалуронидаз приводят к анафилактическим реакциям.

Гиалуронидаза из крупного рогатого скота, помимо её непрямого антиракового действия, обладает прямым антиканцерогенным действием. Гиалуронидаза предотвращает рост трансплантированных мышам опухолей (De Maeyer et al. //Int. J. Cancer. 1992, v. 51, p. 657-660) и ингибируют образование опухолей после действия канцерогенов (Pawlowski et al. //Int. J. Cancer. 1979, v. 23, p. 105-109; Haberman et al. //Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C. 1981, v. 22, p. 105, тезис № 415).

Принимая во внимание значение гиалуронидаз из крупного рогатого скота как терапевтического средства, особенно в химиотерапии в сочетании с обычными химиотерапевтическими средствами, и самой по себе как химиотерапевтического средства, в данной области существует потребность в существенно чистых препаратах гиалуронидазы человеческого происхождения. Существует также потребность в эффективных, экономически выгодных способах получения гиалуронидазы для получения имеющих промышленное значение количеств фермента. Настоящее изобретение направлено на решение этих проблем.

Гиалуроновая кислота является важным компонентом внеклеточного матрикса. Гиалуроновая кислота обнаружена в соединительных тканях млекопитающих и является главной составляющей стекловидного тела глаза. В соединительной ткани связанная с гиалуроновой кислотой гидратная вода создаёт просветы между тканями, образуя окружение, способствующее перемещению и пролиферации клеток. Гиалуроновая кислота играет ключевую роль в биологических процессах, связанных с подвижностью клеток, включая быстрое развитие, регенерацию, репарацию, эмбриогенез, эмбриологическое развитие, залечивание ран, ангиогенез и онкогенез (развитие опухолей) (Toole //«Cell Biol. Extracell. Matrix». Под ред. Hay. Plenum Press, New York, 1991, p. 1384-1386; Bertrand et al. //Int. J. Cancer. 1992, v. 52, p. 1-6; Knudson et al. //FASEB J. 1993, v. 7, p. 1233-1241). Кроме того, уровни гиалуроновой кислоты коррелируют с агрессивностью раковых опухолей (Ozello et al. //Cancer Res. 1960, v. 20, p. 600-604; Takeuchi et al. //Cancer Res. 1976, v. 36, p. 2133-2139; Kimata et al. //Cancer Res. 1983, v. 43, p. 1347-1354).

После повреждения спинного мозга глиальные рубцы создаются астроцитами и содержат хондроитин-сульфат-протеогликаны (ХСПГ). ХСПГ играют ключевую роль в ингибировании роста аксонов (Levine, 1994; Powell et al., 1997). Например, в ходе развития зародыша ХСПГ отклоняют аксоны и ингибируют адгезию нервных клеток. ХСПГ играют также важную роль в образовании пограничного слоя (Snow et al., 1990, 1992; Powell and Geller, 1999). Кроме того, экспрессия ХСПГ повышается после повреждения центральной нервной системы (McKeon et al., 1991; Davies et al., 1997).

Исследования показывают, что ингибирующее действие ХСПГ преимущественно связано с сахарной цепью хондроитин-сульфат-гликозаминогликана (Snow et al., 1990; Cole and McCable, 1991; Geisert and Bidanset, 1993). Это подтверждается обнаружением того, что внутриоболочечное введение бактериальной ходроитиназы действительно способствует регенерации аксонов. Более того, в электрофизиологических опытах установлено, что регенерированные аксоны, подвергнутые электрошоку, устанавливают функциональные соединения (Bradbury et al., 2002). Кроме прямого ингибирующего действия, ХСПГ могут также взаимодействовать с молекулами клеточной адгезии или нейротропными факторами, влияя на выпячивание отростков нейритов (Roberts et al., 1988; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Milev et al., 1994). Поэтому рекомбинантные гиалуронидазы млекопитающих полезны для обращения ингибирующего действия ХСПГ в глиальных рубцах и для поддержки регенерации аксонов после повреждения.

Количество sHASEGP, необходимое для существенного разрушения ХСПГ в глиальных рубцах, может варьировать. В некоторых случаях для удаления ХСПГ из рубцов может потребоваться повторное внутриоболочечное введение 10-5000 ед. sHASEGP. В других случаях может быть предпочтительным длительное высвобождение sHASEGP при использовании композиций с медленным высвобождением. В качестве альтернативы для усиления расщепления ХСПГ может быть эффективным введение векторов генной терапии, кодирующих sHASEGP.

Можно также использовать sHASEGP для лечения грыжевых дисков с помощью процесса, известного как хемонуклеолиз. Хондроитиназа ABC и фермент, расщепляющий подобные субстраты (такой как sHASEGP), может индуцировать снижение внутридискового давления в поясничном отделе позвоночника (Sasaki et al., 2001; Ishikawa et al., 1999). Существуют три типа повреждений дисков. Выпяченный диск - это диск интактный, но выступающий. В вытесненном диске волокнистый покров разорван и нуклео-

плазма вытекла, но ещё соединена с диском. В изолированном диске фрагмент нуклеоплазмы разрушен и утрачен из диска и свободно располагается в позвоночном канале. Хемонуклеолиз эффективен при повреждениях выпяченных и вытесненных дисков, но не для изолированных дисков.

В США хемонуклеолиз разрешён только для использования в поясничном (нижнем) отделе позвоночника. В других странах он также был успешно применён для лечения шейных (в верхней части позвоночника) грыж. Таким образом, хемонуклеолиз - это консервативная альтернатива дисковой хирургии, если она предпочтительна для снижения давления в дисках.

Точный состав и структура углеводной цепи (углеводных цепей) в гликопротеине может непосредственно влиять на его время жизни в сыворотке, так как клетки печени и ретикулоэндотелиальная система могут связывать и интернализовать циркулирующие гликопротеины со специфическими углеводами. Гепатоциты имеют на своей поверхности рецепторы, распознающие олигосахаридные цепи с терминальными остатками Gal (т.е. находящимися на наиболее удалённом конце (концах) гликанов относительно полипептида), макрофаги имеют рецепторы для терминальных остатков Man или GlcNAc, и гепатоциты и лимфоциты имеют рецепторы для доступных остатков фукозы. Однако не были обнаружены рецепторы, специфичные по отношению к сиаловой кислоте. Хотя кое-что зависит от пространственного окружения олигосахаридов, основное правило гласит, что чем больше число экспонированных сахарных остатков, распознаваемых рецепторами поверхности клеток в печени и ретикуло-эндотелиальной системе, тем быстрее гликопротеин будет удалён из сыворотки. Однако, благодаря отсутствию специфичных к сиаловой кислоте рецепторов, олигосахариды, у которых все ветви завершены или «увенчаны» сиаловой кислотой, не способствуют расщеплению белка, к которому они прикреплены.

Наличие и природа олигосахаридной цепи (цепей) на гликопротеине может также, помимо его распознавания сахароспецифичными рецепторами на клетках печени и ретикуло-эндотелиальной системы, влиять на его важные биохимические свойства. Удаление углевода из гликопротеина обычно снижает его растворимость и может также повышать его восприимчивость к протеолитической деструкции путём дестабилизации правильного сворачивания (фолдинга) полипептида и/или демаскировки чувствительных к протеазам сайтов. По этим же причинам статус гликозилирования протеина может влиять на его распознавание иммунной системой.

Можно использовать sHASEGP для удаления скопления клеток (кумулюсных клеток), окружающих яйцеклетку, перед криоконсервацией и другими процедурами фертилизации in vitro (IVF), такими как внутрицитоплазматическая инъекция спермы (ВЦИС). К собранным овоцитам можно добавить гиалуронидазу в концентрации от 10 до 200 ед./мл в забуференных солевых растворах. Овоциты отделяют отсасыванием от высвобожденных кумулюсных клеток и промывают несколько раз средой без гиалуронидазы. Затем яйцеклетки можно обработать для криоконсервации или техники IVF.

Полезно использовать также sHASEGP для обеспечения более эффективного проникновения химиотерапевтических агентов в плотные (солидные) опухоли. Можно инъецировать sHASEGP в опухоль вместе с противораковыми агентами или проводить инъекцию внутривенно в случае диссеминированных типов рака или опухолей, доступ к которым затруднён. Противораковым агентом может быть химиотерапевтическое соединение, антитело, пептид или осуществляющие генотерапию вектор, вирус или ДНК. Кроме того, можно использовать sHASEGP для возвращения раковых клеток в циклический пул для повышения чувствительности до этого устойчивых к химиотерапии опухолей, приобретших множественную лекарственную устойчивость (St. Croix et al. //Cancer Lett. 1998, v. 131, № 1, p. 35-44). Полезны sHASEGP также для усиления доставки биологических средств, таких, как моноклональные антитела, цитокины и другие лекарственные средства, в опухоли, накапливающие гликозаминогликаны. У многих опухолей делетированы гены, отвечающие за катаболизм гликозаминогликанов, так что их локализованное накопление может мешать противоопухолевым агентам и иммунной системе достигать массы опухоли.

Можно также применять sHASEGP для повышения чувствительности опухолей, устойчивых к обычной химиотерапии. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения sHASEGP вводят пациенту, имеющему опухоль, ассоциированную с дефектом LuCa-1, в количестве, эффективном для повышения диффузии вокруг местонахождения опухоли, например, для повышения циркуляции химиотерапевтических средств, например, путём облегчения циркуляции и/или повышения концентрации химиотерапевтических средств внутри и вокруг местонахождения опухоли, ингибирования подвижности опухоли, например, путём расщепления гиалуронана (ГУ) и/или для понижения у опухолевой клетки (клеток) порога апоптоза, т.е. для приведения опухолевой клетки (клеток) в состояние аноикии, когда опухолевая(ые) клетка(и) становится более восприимчивой к действию химиотерапевтических средств или других средств, которые могут способствовать гибели клеток, более предпочтительно способствуя программированной гибели клеток в состоянии аноикии.

Термин «химиотерапевтические средства», как он использован в настоящей работе, подразумевает, что он охватывает все молекулы, синтетические (например, «цисплатин») и существующие в природе (например, фактор некроза опухолей), которые способствуют ингибированию роста опухолевых клеток и предпочтительно способствуют, предпочтительнее преимущественно способствуют гибели опухолевых клеток.

Особенный интерес представляет применение sHASEGP для лечения метастазирующих и немета-

стазирующих раковых заболеваний, особенно метастазирующих типов рака, имеющих сниженную вплоть до неразличимости активность гиалуронидазы по сравнению с нераковыми (нормальными) клетками. Можно использовать sHASEGP как химиотерапевтическое средство (само по себе или в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами) в лечении любого из множества типов рака, в частности инвазивных опухолей. Например, sHASEGP можно использовать для лечения карциномы мелких клеток лёгких, карциномы сквамозных клеток лёгких, а также всех типов рака молочной железы, яичников, головы и шеи, или любого другого типа рака, ассоциированного с подавленными уровнями гиалуронидазы или с дефектным геном LuCa-1 (hpHAаза) (например, геном LuCa-1, который не обеспечивает адекватный уровень экспрессии hpHAазы (полипептида гиалуронидазы человека) или кодирует дефектную гиалуронидазу, которая не обеспечивает адекватный уровень гиалуронидазной активности), или с иным дефектом, связанным с подавлением катаболизма гиалуронана. sHASEGP предпочтителен для лечения злокачественных опухолей, связанных с дефектным катаболизмом ГУ, поскольку в этом случае для деструкции не требуется участие клеток.

Специалист с обычной квалификацией в данной области может легко определить подходящую для введения специфическую дозировку, исходя из обсуждённых выше факторов (см., например: Harrison //"Principles of Internal Medicine", 11-е изд., 1987). Кроме того, оценки подходящих дозировок для человека могут быть получены экстраполяцией из определений уровня ферментативной активности sHASEGP in vitro и/или дозировок, эффективных в исследованиях на животных. Например, 70-300 ед. TRU гиалуронидазы эффективны в снижении опухолевого давления у мышей линии scid. Принимая во внимание эту информацию, соответствующие дозировки для человека средним весом 70 кг должны быть в интервале от приблизительно 250000 до приблизительно 1200000 TRU гиалуронидазы. Количество вводимого пациенту-человеку sHASEGP обычно находится в интервале от приблизительно 1 TRU до приблизительно 5000000 TRU ферментативной активности, предпочтительно от приблизительно 1000 TRU до приблизительно 2500000 TRU, более предпочтительно от приблизительно 100000 TRU до 1500000 TRU, нормально от приблизительно 250000 TRU до 1200000 TRU, при средних предписанных дозах около 725000 TRU.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлена композиция с sHASEGP в 0,15 М растворе соли, содержащем sHASEGP в концентрации около 150000 TRU/мл. Композицию затем вводят внутривенной инъекцией при дозировке 15000 TRU/кг массы тела пациента. В качестве альтернативы ферментную композицию можно также ввести подкожной инъекцией, чтобы обеспечить возможность перфузии гиалуронидазы вокруг места опухоли. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения sHASEGP инъецируют около опухоли или в толщу опухоли. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения sHASEGP входит в состав липосомной композиции и доставляется инъекцией либо внутривенно, либо в месте, либо возле места роста раковых клеток, имеющих дефект гена LuCa-1 (ген hpHAазы). Внутривенная инъекция sHASEGP приводит к попаданию sHASEGP в место развития опухоли. Кроме того, сверхсиалированный sHASEGP предпочтителен для парентерального введения, так как оконечные сиаловые кислоты на sHASEGP предотвращают выведение фермента из циркуляции ретикуло-эндотелиальной системой. Сравнение сверхсиалированного sHASEGP с несиалированной гиалуронидазой крупного рогатого скота и другими несиалированными гиалуронидазами показывает, что достигается гораздо более благоприятная фармакокинетика.

Помощь в генной терапии.

Эффективность большинства переносчиков для достаки генов in vivo не соответствует их эффективности, достигнутой in vitro. Гликозаминогликаны могут препятствовать переносу и диффузии ДНК и вирусных векторов во многих типах клеток. Этот материал внеклеточного матрикса может существенно подавить процесс. Дубенский с соавторами (Dubensky et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984, v. 81, № 23, p. 7529-7533) показали, что гиалуронидаза в соединении с коллагеназой может улучшить трансдукцию ДНК in vivo. Было установлено, что аденоассоциированный вирус также может осуществлять генную терапию при посредстве гиалуронидазы (Favre et al. //Gene Ther. 2000, v. 7, № 16, p. 1417-1420).

Авторы настоящего изобретения установили, что sHASEGP открывает во внеклеточном матриксе каналы определённого размера. Эти поры не способны усилить диффузию веществ диаметром более 200-500 нм. Однако sHASEGP может усиливать диффузию молекул меньшего размера, таких как ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и комплексы ДНК.

В качестве альтернативы вирусы можно снабдить геном sHASEGP, чтобы способствовать их репликации и распространению, например, в целевой ткани. Целевой тканью может быть раковая ткань, в соответствии с чем вирус становится способным к селективной репликации внутри опухоли. Вирус может быть также нелитическим вирусом, причём вирус селективно реплицируется под контролем тканеспецифичного промотора. Когда вирус реплицируется, совместная экспрессия sHASEGP с вирусными генами будет способствовать распространению вируса in vivo.

В качестве альтернативы представляющая интерес нуклеиновая кислота и sHASEGP могут применяться одновременно или последовательно или так, чтобы их введение было распределено во времени. Одновременно - относится к совместному введению. В этом случае два необходимых компонента могут

быть смешаны с образованием композиции перед введением или они могут быть введены в клетку или в организм-хозяин в одно и то же время. Можно также вводить их последовательно, т.е. один после другого, вне зависимости от того, какой компонент комбинации по настоящему изобретению вводится первым. Наконец, можно использовать способ введения, который распределён во времени или прерывается, или же прерывается и возобновляется через интервалы времени, которые могут быть или могут не быть регулярными. Важно отметить, что пути и места введения двух компонентов могут быть различными. В соответствии с одним особенно предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, sHASEGP вводят до нуклеиновой кислоты, причём путь введения двух компонентов предпочтительно один и тот же. Интервал времени между инъекциями не очень важен и может быть определён опытным специалистом. Можно рекомендовать интервал от 10 мин до 72 ч, полезно от 30 мин до 48 ч, предпочтительно от 1 до 24 ч и весьма предпочтительно от 1 до 6 ч.

Кроме того, композицию (продукт в соответствии с настоящим изобретением) можно также объединять с одной или более из молекул, которые предназначены для улучшения введения нуклеиновой кислоты. Этими молекулами могут быть молекулы, обладающие защитным действием по отношению к нуклеиновой кислоте (защита от разрушения в клетке), которые улучшают её проникновение в клетку-хозяин или экспрессию её в клетке-хозяине (это могут быть способный к слиянию пептид, сигнал ядерной локализации и т.д.), обеспечивают нацеливание на определённый тип клеток (лиганд или антитело, распознающие белок клеточной поверхности и т.д.) или пролонгирующие терапевтический эффект (иммуносупрессирующее средство и т.д.). Композиция может быть также объединена с агентами, улучшающими трансфекцию (белки и т.д.).

Композицию по настоящему изобретению можно готовить с учётом местного или парентерального введения или для введения через пищеварительный тракт. Путями, которые следует особо упомянуть, являются внутрижелудочный, подкожный, внутрисердечный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутрисуставной, внутриопухолевый, внутрилёгочный, интраназальный и внутритрахеальный и, в особенности, внутримышечный путь. Введение может быть произведено с помощью любой известной техники (инъекция, введение через рот, аэрозоль, закапывание и т.д.), единичной дозой или дозой, которая повторяется один или несколько раз через определённый интервал времени. Путь введения может быть выбран таким образом, чтобы он соответствовал возможности передачи целевого гена и лечения заболевания. Композиция может включать фармацевтически приемлемые носители (наполнители, адъюванты и т.д.). Вызывающее разрушение внеклеточного матрикса вещество и целевую нуклеиновую кислоту предпочтительно растворяют в буфере, подходящем для фармацевтического применения, который может быть гипертоническим, гипотоническим или изотоническим. Могут быть предусмотрены различные буферы. Для иллюстрации могут быть упомянуты следующие буферы:

физиологический солевой раствор (0,9% NaCl), не физиологический солевой раствор (1,8% NaCl),

раствор Рингера с HEPES (оксиэтилпиперазин-этансульфонат),

раствор Рингера с лактатом, буфер на основе трис-HCl (10 мМ трис-HCl, pH от 7,5 до 8, 1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-HCl, pH от 7,5 до 8, 1 мМ $MgCl_2$),

фосфатный буфер (фосфатный буфер с H_2O по Кребсу),

раствор сахара (глюкозы, сахарозы, трегалозы и т.д.) или просто вода.

Подкожное введение жидкости.

Подкожное введение (вливание) жидкости - это удобный и лёгкий способ введения воды пациентам со слабым и умеренным обезвоживанием, особенно людям пожилого возраста. Способ считается безопасным и не связан с серьёзными трудностями. Наиболее частый побочный эффект - это небольшой подкожный отёк, с которым справляются местным массажем или системным введением диуретиков. За период 24 ч в два разных места можно ввести около 3 л. Обычными местами вливания являются грудная клетка, живот, бёдра и плечи. Предпочтительный раствор - это нормальный физиологический солевой раствор, хотя могут быть использованы и другие растворы, такие как половинный солевой раствор, глюкоза в физиологическом солевом растворе или 5% глюкоза. При необходимости в ёмкость с раствором может быть добавлен хлорид калия. Кроме того, подобным путём могут быть введены другие лекарства. Для усиления поглощения жидкости и повышения общей скорости введения можно добавить sHASEGP человека. Для повторяемого подкожного вливания жидкостей sHASEGP человека предпочтителен перед ферментами из скотобойни, так как он не иммуногенен, в отличие, как известно, от фермента крупного рогатого скота. Его могут вводить в домашних условиях члены семьи или медсестра, и с этой техникой должен быть знаком каждый семейный врач.

У амбулаторных пациентов места для подкожного вливания включают живот, грудную клетку (над молочными железами) межрёберное пространство и лопаточную область. Для лежачих пациентов предпочтительными местами являются бёдра, живот и наружная поверхность плеч. Через 1-4 дня иглу и трубки следует сменить, хотя устройства для вливания оставляли на месте без всяких проблем в течение более длительных периодов. Можно также провести введение ударных вливаний («болюсов») по 500 мл в течение 1-2 ч три раза в день с введением 150 ед. sHASEGP подкожно перед первым утренним вливанием.

Улучшение терапевтических инъекций.

Многие молекулы, если они введены через кожу, попадают в кровоток медленно или с очень низкой эффективностью. Фармакокинетику и фармакодинамику молекул, введённых инъекцией подкожно (п/к) или внутримышечно (в/м), регулируют несколько факторов. Как правило, молекулы большего размера при отсутствии активного транспорта достигают кровотока медленнее и менее эффективно. Биологическую доступность при подкожном введении определяют, вычисляя отношение площадей под кривыми (ППК) для подкожного и внутривенного введений ($ППК_{п/к}/ППК_{в/в}$). Вторым фактором является заряд и сродство к молекулам матрикса, что может играть роль в подкожном накоплении молекул. Если эти материалы разрушаются в месте введения, они могут никогда не достигнуть своих желательных мишеней, что приведёт к снижению общей организменной биологической доступности по отношению к органам-мишеням.

Крупные белки обычно вводят внутривенно, так что медикамент прямо поступает в кровоток. Может, однако, оказаться удобным, чтобы медикамент можно было ввести подкожно, внутримышечно или внутрикожно, так как эти пути введения гораздо легче переносятся пациентом. Это особенно важно, если медикамент нужно вводить регулярно в течение всей жизни и лечение нужно начать рано, уже в детском возрасте пациента. Однако медикамент с очень большой и лабильной молекулой, такой как фактор коагуляции VIII с молекулярной массой от 170 до 300 кДа, обычно имеет низкую биологическую доступность, если он введён подкожно, внутримышечно или внутрикожно, так как усвоение недостаточно, а деструкция - сильная.

Кроме необходимости повысить биологическую доступность многих вводимых подкожно биологических веществ, в случаях экстренной медицинской помощи существенно важна также более быстрая фармакокинетика. У многих пациентов время, за которое достигается внутривенный доступ, таково, что это делает невозможным применение лекарства, которое при системном введении действует достаточно быстро. В некоторых случаях за неудачей в достижении внутривенного доступа следует подкожная инъекция, что ещё больше отодвигает достижение органа-мишени. Таким образом, более быстрая биологическая доступность подкожно вводимых лекарств дала бы преимущество этому способу первоочередного лечения, взамен риска получить слишком большое время достижения внутривенного доступа. Примеры молекул, которые можно вводить подкожно так же, как и внутривенно, включают эпинефрин, атропин, наркан, лигнокаин и декстрозу.

Дополнительное преимущество настоящего изобретения заключается в способности доставлять п/к или в/м равные или большие объёмы растворов без боли и повреждений, связанных с давлением и большим объёмом раствора в месте инъекции.

Кровоизлияние в стекловидное тело.

В попытке минимизировать опасность дальнейшего отслоения или повреждения сетчатки при проведении витректомии Hageman ранее предложил (патент США № 5292509) инъецировать в стекловидное тело некоторые не содержащие протеаз гликозаминогликаназные ферменты, чтобы до удаления стекловидного тела предотвратить его связывание с сетчаткой или проникновение в сетчатку. Такое предотвращение проникновения или связывания стекловидного тела нацелено на минимизирование опасности того, что при удалении стекловидного тела может произойти дополнительное повреждение или отслоение сетчатки. Примеры специфических не содержащих протеаз гликозаминогликаназных ферментов, которые можно использовать для предотвращения такого проникновения стекловидного тела, включают хондроитиназу ABC, хондроитиназу AC, хондроитиназу B, хондроитин-4-сульфатазу, хондроитин-6-сульфатазу, гиалуронидазу и бета-глюкуронидазу.

Хотя было известно, что фермент гиалуронидаза полезен для различных офтальмологических применений, включая применение при витректомии, описанное в патенте США № 5292509 (Hageman), опубликованные результаты исследований указывали на то, что гиалуронидазный фермент сам может быть токсичен для сетчатки и/или других анатомических структур глаза (см. Gottleib J.L. //"The Safety of Intravitreal Hyaluronidase"; Antoszyk A.N., Hatchell D.L. and Soloupis P. //Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. 1990. N. 31, № 11, p. 2345-2352). Более того, используемые неочищенные препараты гиалуронидазы со скотобоен могут вызывать увеит или воспаление глаза. Поэтому применение человеческого sHASEGP предпочтительно из-за его более высокой эффективности и чистоты, а также из-за того, что он не имеет животного происхождения и поэтому не может вызвать при повторном применении иммунологических реакций и направляемой антителами нейтрализации. В другом осуществлении в глаз можно инъецировать ПЭГилированную форму sHASEGP. Такой ПЭГилированный sHASEGP не так быстро выводится из стекловидного тела и сохраняет свою активность в стекловидном теле в течение более длительного времени.

Офтальмологическая токсичность некоторых препаратов гиалуронидазы была подтверждена другими исследователями, которые предположили, что такие препараты гиалуронидазы следует использовать как токсический раздражитель в моделях токсичности у животных, чтобы вызывать экспериментально возбуждаемую неоваскуляризацию глаз (см. Antoszyk A.N., Gottleib J.L., Casey R.C., Hatchell D.L and Machemer R. "An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit". //Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. 1991, v. 32, № 1, p. 46-51). Для внутриглазных процедур предпочтительно использовать высокоочищенный sHASEGP, не содержащий связанных с ртутью и ведущих происхождение от скота или бак-

терий примесей. Более того, рекомбинантный человеческий sHASEGP предпочтителен перед препаратами со скотобоен, благодаря его чистоте - отсутствию патогенов крупного рогатого скота, и сниженному риску иммуногенности. ПЭГилированный sHASEGP рассматривается как наиболее предпочтительный.

Косметические применения sHASEGP.

Известно, что гиалуронидаза имеет свойство деполимеризовать длинные мукополисахаридные цепи основного вещества, ответственные за удержание связанной воды и за замедление, вследствие сжатия капилляров, диффузии органических жидкостей, которая удаляет отходы метаболизма. Такое удержание воды и отходов, связанное с перегрузкой липоцитов жиром, дает классические водянки типа "свиной кожи" или "апельсиновой корки". Поэтому такая деполимеризация разрезает длинные цепи мукполисахаридов на более короткие цепи, что приводит к удалению связанной воды и отходов, восстановлению венозной и лимфатической циркуляции и исчезновению местных водянок.

Вследствие этого для удаления гликозаминогликанов, участвующих в накоплении так называемого целлюлита и усиления лимфатического тока предпочтительно использование sHASEGP с его подкожным введением. Для лечения целлюлита предпочтительно применение человеческого sHASEGP, потому что он способен удалять указанные гликозаминогликаны, но не содержит ведущие к воспалению компоненты белков, получаемых на скотобойнях, имеет высокую степень чистоты и, по-видимому, не иммуногенен. Можно вводить sHASEGP повторными подкожными инъекциями, с помощью чрескожной доставки в форме мазей или кремов или путём использования инъецируемых композиций с медленным высвобождением для обеспечения непрерывной деструкции гликозаминогликанов и предотвращения их возврата.

Трансплантация органов.

Гиалуронан обладает рядом биологических действий, которые частично зависят от его молекулярного размера (West D.C., Kumar S. //Exp. Cell Res. 1989, v. 183, p. 179-196). Содержание гиалуронана в органе повышается при различных состояниях воспаления этого органа. Так, было установлено, что концентрация гиалуронана повышена в тканях различных органов, для которых характерно воспалительно-иммунологичское повреждение, такое как альвеолит (Nettebladt O. et al. //Am. Rev. Resp. Dis. 1989, v. 139, p. 759-762) и инфаркт миокарда (Waldenstorm et al. //J. Clin. Invest. 1991, v. 88, № 5, p. 1622-1628). Другими примерами являются отторжение трансплантата (Hallgren et al. //J. Exp. Med. 1990, v. 171, p. 2063-2076; Wells et al. //Transplantation. 1990, v. 50, p. 240-243), пересадка тонкой кишки (Wallander et al. //Transplant. Int. 1993, v. 6, p. 133-137) или сердца (Hallgren et al. //J. Clin. Invest. 1990, v. 85, p. 668-673); или воспаление миокарда вирусного происхождения (Waldenstorm et al. //Eur. J. Clin. Invest. 1993, v. 23, p. 277-282).

В области трансплантационной хирургии серьёзную проблему представляет появление интерстициальных водянок при пересадке органов. До 25% трансплантатов набухают до такой степени, что функция на время утрачивается.

Более того, в 2-3% случаев набухание приводит к повреждению почек, приводя к массивному кровоизлиянию.

Можно использовать sHASEGP для разрушения в пересаженном органе накопившихся гликозаминогликанов. Удаление таких гликозаминогликанов способствует удалению воды из трансплантата и, вследствие этого, нормальному функционированию органа. Для снятия интерстициального напряжения как такового можно вводить дозы в диапазоне от 500 до 10000 ед. на 1 кг массы тела.

Патологическое накопление гликозаминогликанов в мозге.

Уровни гиалуронана повышены при большом числе болезненных состояний спинного мозга. У взрослых в норме уровни спинно-мозгового гиалуронана составляют менее 200 мкг/л (Laurent et al. //Acta Neurol. Scand. 1996, v. 94, № 3, p. 194-206). Этот уровень повышается, превышая 8000 мкг/л, при заболеваниях, таких как менингит, стеноз позвоночника, травмы головы и инфаркт спинного мозга. Поэтому для разрушения субстрата при критическом повышении его уровня можно использовать введение sHASEGP либо внутриоболочечным путём, либо путём системной инъекции сверхсиалированного sHASEGP.

Недостаток в мозгу эффективных лимфатиков может также приводить после травмы головы к угрожающей жизни водянке. Накопление гиалуронана является результатом его повышенного синтеза гиалуронан-синтазами и сниженной деструкции. Накопление гиалуронана служит целям повышения содержания воды в повреждённой ткани для облегчения выброса лейкоцитов, но оно может быть летальным. Поэтому введение человеческого sHASEGP пациенту с травмой головы может прекратить тканевое накопление гиалуронана и связанной с ним воды. Человеческий sHASEGP можно вводить внутриоболочечным способом через катетер или в качестве альтернативы сверхсиалированный sHASEGP можно вводить внутривенно, чтобы он достиг мозговой ткани.

После инсульта и возникающей при нём ишемии содержание гиалуронана резко повышается вследствие повышения экспрессии ГУ-синтаз и сниженного катаболизма. Нарушение работы ионных насосов и накопление плазмы в межтканевом пространстве приводит к удержанию жидкости, не удаляемой в достаточной степени лимфатиками, результатом чего является некроз тканей. Некоторые группы пытались предотвратить интерстициальное накопление жидкости после ишемической повторной перфузии блокированием проницаемости сосудов. Однако, как только жидкость удалена из сосудов, нарушение проницаемости сосудов может препятствовать снятию отёка и усугубить болезненное состояние.

Можно также использовать человеческий sHASEGP для снятия отёков, сопровождающих опухоли мозга, в особенности связанные с множественными формами глиобоастомы. Связанные с опухолями мозга отёки возникают вследствие накопления гиалуронана в нераковых областях мозга, прилегающих к опухоли. Введение гиалуронидазы в места накопления гиалуронана (например, путём внутривенной инъекции или через катетер) может уменьшить связанные с такими злокачественными новообразованиями отёки путём разрушения в этих местах избыточного гиалуронана. Поэтому применение гиалуронидазы при лечении опухолей мозга полезно не только для снижения массы опухоли и подавления роста и/или метастазирования опухоли, но и для снятия отёка, сопровождающего новообразование. Для снятия отёков можно вводить человеческий sHASEGP таким же образом, как вводят бычью тестикулярную гиалуронидазу для лечения отёков (см., например Sa Earp //Arq. Braz. Med, v. 44, p. 217-220).

Воздействие на накопление гликозаминогликана при сердечно-сосудистом заболевании.

Было установлено, что введение гиалуронидазы после экспериментального инфаркта миокарда в животных моделях может уменьшить размер зоны инфаркта (Maclean et al. //Science. 1976, v. 194, № 4261, p. 199-200). Предполагаемый механизм, по которому бычья гиалуронидаза уменьшает размер зоны инфаркта у животных, состоит в снижении накопления гиалуронана, которое обнаруживается после повторной ишемической перфузии. Считают, что уменьшение размера зоны инфаркта происходит вследствие усиления лимфатического дренажа, усиления оксигенации ткани и снижения содержания воды в миокарде. Хотя на животных моделях можно было добиться уменьшения размера зоны инфаркта, этот успех не воспроизвёлся при расширенных клинических испытаниях на людях. У бычьей тестикулярной гиалуронидазы было очень короткое время полужизни в сыворотке у животных и человека - около 3 мин (Wolf et al. //J. Pharmacol. Exp. Ther. 1982, v. 222, № 2, p. 331-337). Это короткое время полужизни объясняется наличием концевых остатков маннозы, которые легко распознаются "чистящими" рецепторами ретикулоэндотелиальной системы. Хотя у маленьких животных применение гиалуронидазы может быть успешным вследствие меньшей площади поверхности сосудов, необходимо иметь фермент с увеличенным временем полужизни. Сверхсиалированный sHASEGP имеет более благоприятную фармакокинетику, благодаря сиалированию, для которого нет чистящих рецепторов. Сверхсиалированный sHASEGP в дозах в диапазоне от 100 до 200000 ед./кг массы тела может быть применён для облегчения ликвидации избытка гиалуронана после ишемической реперфузии и уменьшения размера зоны инфаркта.

Сверхсиалированный sHASEGP можно также использовать для ограничения развития коронарных бляшек при артериосклерозе. Такие бляшки накапливают гликозаминогликаны и являются посредниками в адгезии макрофагов и ксантомных клеток (Kolodgie et al. //Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2002, v. 22, № 10, p. 1642-1648). Введение сверхсиалированного sHASEGP можно использовать для снижения образования бляшек. Поскольку имеются в виду повторные введения гиалуронидазы в дозах от 100 до 100000 ед./кг, необходимо использовать человеческий рекомбинантный белок с низким риском иммуногенности и увеличенным временем полужизни. Это приведёт к весьма эффективному снижению размера бляшек.

Лечение некроза периферических тканей.

Некроз тканей возникает при многих заболеваниях вследствие венозной недостаточности. Одним из главных препятствий для восстановления роста ткани является недостаточная оксигенация. Было установлено, что внутриартериальное введение гиалуронидазы существенно улучшает клиническую картину у пациентов с окклюзионным поражением артерий (Elder et al. //Lancet. 1980, p. 648-649). Можно инъецировать sHASEGP внутриартериально 3-5 раз в неделю при дозировке от 10 до 200000 ед.

Улучшение анестезии.

Полученную со скотобоен гиалуронидазу обычно используют для перибульбарной блокады при местной анестезии перед офтальмологической хирургической операцией. Присутствие фермента предотвращает необходимость дополнительной блокады и сокращает время достижения акинезии (отсутствие движений глаз). Наиболее общим является перибульбарное и подсухожильное введение гиалуронидазы при офтальмологических процедурах. Со времени прекращения применения препарата Wydase® были опубликованы сообщения об усилении диплопии (двоения) и птоза (опущения верхнего века) при перибульбарной блокаде (Brown et al. //J. Cataract. Refract. Surg. 1999, v. 25, p. 1245-1249).

После приостановки Виетом (Wyeth) использования препарата Wydase® гиалуронидазный материал из бычьих тестикул поставляется сейчас в лекарственных препаратах составного применения. Однако есть некоторые сомнения по поводу применения составленного экспромтом стерильного продукта: http://www.ashp. orq/shortaqe/hvaluronidase.sfm?cfid=11944667&CFToken=9426953-ref#ref. Составные препараты не являются разрешёнными Фармакологическим комитетом (Food and Drug Association, FDA). Поэтому FDA не контролирует качество или постоянство процесса производства.

sHASEGP в количествах от 10 до 500 ед. может быть смешан непосредственно с 5 мл 2% лидокаина (Xylocaine), 5 мл 0,5% бупивакаина (Marcaine) и, по усмотрению, с эпинефрином в соотношении 1:200000. Можно использовать sHASEGP для ускорения наступления акинезии и для исключения необходимости дополнительной блокады. sHASEGP также идеален для получения акинезии при косметической хирургии (пластические операции на веках и подтягивание кожи лица). Можно также использовать

sHASEGP после таких хирургических операций для усиления диффузии противовоспалительных средств и для снижения отёка тканей.

Можно также смешивать sHASEGP с забуференными растворами, такими как бикарбонат, для предотвращения дискомфорта в ходе процедуры инъекции, с препаратами для анестезии разрывов, чтобы уменьшить общий объём необходимого для инъекции материала и ослабить боль из-за набухания ткани.

Снижение внутриглазного давления.

Повышение внутриглазного давления, возникающее рано и иногда затягивающееся, является общим побочным эффектом, возникающим у пациентов после операции катаракты. Такое болезненное состояние иногда бывает серьёзным, особенно у пациентов с глаукомными изменениями хрусталика. Хотя повышение давления имеет тенденцию быть более серьёзным, когда в ходе операции в глаз водят вязкоупругие средства, такие как гиалуроновая кислота, внутриглазное давление может повышаться после операции, даже если такие средства не использовали. Более того, такое повышение давления может происходить даже тогда, когда в ходе хирургической процедуры вообще не использовали никаких дополнительных медикаментов. В некоторых случаях удобно оставлять вязкоупругое средство в глазу, из-за чего часто необходимо вводить пациентам большие дозы ингибитора карбоангидраз. Эти ингибиторы снижают внутриглазное давление, уменьшая образование водной тканевой жидкости, которую в норме секретирует в глаз реснитчатое тело. Обычные способы уменьшения послеоперационного подъёма внутриглазного давления включают различные типы глазных капель, таких как бета-адренергические блокаторы, симпатомиметические средства, миотики, альфа-II-селективные средства, ингибиторы карбоангидраз и простагландины.

Предпочтительный способ удаления вязкоупругого вещества, такого как гиалуроновая кислота, состоит в инъекции sHASEGP в течение или сразу после хирургической операции на переднем сегменте или заднем сегменте, хотя возможны также и другие способы введения, известные в данной области. Предпочтительно вводить гиалуроновую кислоту и sHASEGP путём инъекции в переднюю камеру в ходе хирургической операции на переднем сегменте глаза, чтобы дать возможность гиалуроновой кислоте действовать в качестве прослойки при начале хирургической процедуры. В некоторых случаях трансплантации роговицы комбинацию гиалуроновой кислоты и sHASEGP можно помещать на поверхность внутриглазных структур перед пришивкой на место трансплантата роговицы. Эту комбинацию можно также использовать при хирургической операции на заднем сегменте, такой как операция на сетчатке или стекловидном теле.

В некоторых случаях может быть целесообразным по окончании хирургической операции оставить вязкоупругое средство, такое как Healon®, Viscoat® или иные заполняющие пространство вещества, в передней камере глаза. Это особенно верно при положительном подъёме давления, когда содержимое глаза стремится переместиться вперёд и давить на заднюю поверхность роговицы. Если это происходит внутри глаза с поставленным на место синтетическим хрусталиком, давление на эндотелий роговицы может серьёзно повредить клетки. За этим может последовать набухание и помутнение роговицы, что приведёт к ухудшению зрения. Обычно, если внутриглазное давление пациента существенно повысилось к концу хирургической операции, для снижения образования воды и/или усиления её оттока необходимо ввести такому пациенту большие дозы ингибитора карбоангидраз, а также поверхностных глазных капель, таких как бета-блокаторы и альфа-II-агонисты. Все эти средства обладают значительными побочными эффектами и в некоторых случаях противопоказаны пациентам с различными типами медицинских болезненных состояний, таких как проблемы с дыханием, болезни сердца или высокое кровяное давление. Однако применение в таких ситуациях sHASEGP исключит необходимость введения таким пациентам больших доз этих лекарств.

Кроме того, в трабекулярной сети содержится значительное количество гиалуроновой кислоты. sHASEGP разрушит её и вследствие этого усилит отток воды через трабекулярную сеть. Это приведёт к снижению у пациента внутриглазного давления. Комбинация sHASEGP с другими средствами для передней камеры, такими как метилцеллюлоза (например, Ocucoat®, поставляемая фирмой Storz Instrument Co.), используемыми как заполнители и/или защитные средства при хирургии катаракты, также будет эффективна для предотвращения существенного повышения давления, поскольку это будет способствовать открытию трабекулярной сети и усилению дренажа жидкости путём разрушения значительного количества гиалуроновой кислоты, присутствующей в трабекулярной сети.

Удаление гликозаминогликанов из трабекулярной сети полезно также для снижения внутриглазного давления у индивидуумов, страдающих открытоугольной глаукомой. Человеческий sHASEGP можно вводить субконъюнктивальной инъекцией или инъекцией прямо в переднюю камеру.

Киста влагалища сухожилия.

Киста влагалища сухожилия (известная также как киста запястья, библейская киста или киста тыльных сухожилий) - это основная масса мягкой ткани руки. Это жидкость, заполняющая мешочек, который можно прощупать под кожей. Обычно она прикреплена к влагалищу сухожилия (выстилке, которая смазывает сухожилие) в руке или запястье или соединена с расположенным ниже суставом; в некоторых случаях, однако, нет видимой связи с какими-либо структурами. Кисты могут иметься также и на ногах.

Часто киста возникает при наличии разрыва связок, покрывающих влагалище сухожилий или суставы, и влагалище выпячивается из дефекта связок, образуя выпуклость под кожей. Поскольку это часто связано с воспалением, воспалённая ткань испускает гелеподобную жидкость, заполняющую выпячивающийся мешочек. Кисты могут быть каменно-твёрдыми из-за высокого давления в заполняющей их похожей на слизь жидкости и часто их по ошибке можно принять за выступы кости.

Для лечения кист влагалища сухожилия можно применять sHASEGP. Инъекция в место повреждения sHASEGP в дозе от 5 до 1000 ед. с последующим отсасыванием тонкой иглой позволяет удалить кисту, не прибегая к хирургической операции. По усмотрению, с sHASEGP могут вводиться кортикостероиды. Некоторым пациентам может понадобиться повторная инъекция.

Микседема.

Инфильтрация кожи гликозаминогликаном (ГАГ) - это характерный признак гипертиреоза, гипотиреоза, узловатого муциноза кожи, склеромикседемы и отёчной склеродермии. При всех болезненных состояниях и в нормальной коже основным ГАГ является гиалуроновая кислота. В распределении ГАГ в коже имеется незначительная гистологическая вариабельность. В приобретённых кожных микседемах в коже наблюдаются похожие распределение ГАГ и их биохимический состав. Морфологические различия, проявляющиеся в активности фибробластов, позволяют предположить, что муцинозы кожи при отёчной склеродермии и склеромикседеме являются локальным процессом, тогда как инфильтрация ГАГ при заболеваниях щитовидной железы может иметь системное происхождение. Эти расстройства могут быть сняты с помощью sHASEGP как при местном, так и при системном путях введения. При лечении хронического заболевания можно предусмотреть применение ПЭГилированного sHASEGP.

Лёгочные применения sHASEGP.

Уровни содержания гиалуронана в бронхоальвеолярных промываниях (БАП) у нормальных индивидуумов обычно ниже 15 нг/мл. Однако при респираторных заболеваниях эти уровни в БАП резко повышаются (Bjermer //Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.). 1987, v. 295, № 6602, p. 803-806). Например, при респираторном дистресс-синдроме у взрослых (ARDS) уровни гиалуронана могут повышаться до 500 нг/мл, а в лёгких фермеров уровни гиалуронана в БАП могут превышать 1000 нг/мл (Hallgren et al. II Am. J. Respir. Dis. 1989, v. 193, № 3, p. 682-687; Larrson et al. //Chest. 1992, v. 101, № 1, p. 109-114). Повышенное содержание гиалуронана в лёгких может препятствовать диффузии кислорода и газообмену, а также активации реакций с участием нейтрофилов и макрофагов.

По многим причинам препараты бычьего sHASEGP для лечения таких болезненных состояний также не очень желательны. Во-первых, известно, что тестикулярные препараты гиалуронидазы со скотобоен загрязнены сериновыми протеазами, такими, как акрозин. Во-вторых, чужеродность бычьих ферментов повышает вероятность анафилактической реакции, которая может привести к смерти пациента. Поэтому либо лёгочным путём, либо внутривенно можно вводить высоко очищенные препараты рекомбинантного человеческого sHASEGP. Человеческий sHASEGP можно также вводить пациентам, страдающих другими лёгочными расстройствами, связанными с повышением содержания гликозаминогликанов, или использовать для усиления доставки в лёгкие других совместно введённых молекул.

Далее изобретение будет описано более детально со ссылкой на нижеследующие не ограничивающие примеры.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1.

Анализ гиалуронидаз методом микротитрования.

Следующий пример предлагает быстрый способ анализа для измерения гиалуронидазной активности sHASEGP. Этот анализ может быть соотнесён с единицами TRU, IU или NFU при использовании стандартного препарата гиалуронидазы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

Анализ методом микротитрования биотинилированного гиалуронана.

Свободные карбоксильные группы остатков глюкуроновой кислоты в гиалуронане (ГУ) биотинилируют в одностадийной реакции с помощью биотин-гидразида (Pierce), сульфо-NHS (Pierce) и 1-этилдиметиламинопропилкарбодиимида (Sigma). Этот субстрат, биотинилированный ГУ, ковалентно пришивают в ячейки микротитровального планшета на 96 ячеек во второй реакции. После завершения ферментативной реакции остаточный субстрат определяют с помощью авидинпероксидазной реакции, итоги которой можно регистрировать в стандартном устройстве для просмотра планшетов ELISA. Поскольку субстрат ковалентно связан с микротитровальным планшетом, искажения, такие как pH-зависимое замещение биотинилированного субстрата, исключаются. Высокая чувствительность позволяет быстро измерять активность гиалуронидазы в культивируемых клетках и биологических образцах с разбросом между различными измерениями менее 10%.

a. Протокол.

Приготовление субстрата биотинилированного ГУ.

Растворяли 100 мг ГУ (Sigma Chemicals) в 0,1 М MES (метилэтансульфонат), pH 5,0 до конечной концентрации 1 мг/мл и оставляли растворяться не менее чем на 24 ч при 4°C перед связыванием с биотином. К раствору CSO_4-MES добавляли сульфо-NHS (Pierse; Rockford, IL) до конечной концентрации 0,184 мг/мл. Биотин-гидразид (Pierce) растворяли в ДМСО, получая базовый раствор с концентраци-

ей 100 мМ, и добавляли его к раствору CSO_4 до конечной концентрации 1 мМ. Базовый раствор 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC) готовили как базовый раствор в дистиллированной воде с концентрацией 100 мМ и добавляли к раствору ГУ-биотина до конечной концентрации 30 мМ. Этот раствор оставляли перемешиваться в течение ночи при 4°С. Несвязанные биотин и EDAC удаляли диализом против воды при 3 сменах 1000-кратного объёма воды. Диализованный, биотинилированный ГУ (бГУ) разделяли на аликвоты и хранили при -20°С до нескольких месяцев.

Сульфо-NHS разбавляли до концентрации 0,184 мг/мл водой с бГУ (с концентрацией 0,2 мг/мл) и распределяли пипеткой в ячейки планшетов на 96 ячеек COVALINK-NH (NUNC; Placerville, NJ) - по 50 мкл в каждую ячейку. EDAC разбавляли водой до концентрации 0,123 мг/мл и пипетировали в планшеты COVALINK-NH с раствором бГУ, получая в итоге в каждой ячейке 10 мкг бГУ и 6,15 мкг EDAC. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°С или в течение 2 ч при 23°С, результаты были сравнимыми. После ковалентной иммобилизации бГУ в микротитровальных планшетах пришивающий раствор удаляли встряхиванием и промывали планшеты 3 раза PBS (забуференный фосфатом солевой раствор), содержащим 2 М NaCl и 50 мМ $MgSO_4$ (буфер А). Планшеты могли храниться до 1 недели при 4°С.

Планшеты COVALINK-NH с иммобилизованным бГУ уравновешивали буфером для анализа (100 мкл на ячейку) либо 0,1 М формиат, pH 3,7, 0,1 М NaCl, 1% детергент тритон X-100, 5 мМ сахаролактон для лизосомной гиалуронидазы, либо 10 мМ HEPES pH 7,4 с 1 мМ $CaCl_2$ и 1 мг/мл человеческого сывороточного альбумина (ICN) для активных в нейтральных условиях ферментов. Набор стандартов для калибровки ферментативной активности в «относительных снижающих мутность единицах» ("relative Turbidity Reducing Units", rTRU) получали, разбавляя бычью тестикулярную гиалуронидазу (Sigma, тип VI-S) в нейтральном буфере для фермента, внося в ячейки от 1,0 до 1×10^{-6} rTRU и анализируя пробы 100 мкл на ячейку с тройным повтором. Пробы активной в кислых условиях гиалуронидазы разбавляли в буфере для анализа лизосомного фермента с коэффициентом разбавления от 1:10 до 1:130000 и пипетировали с тройным повтором по 100 мкл на ячейку. Для большинства анализов экстрактов тканей и плазмы человека была достаточной инкубация в течение 30 мин при 37°С. С тройным повтором включали также ячейки с позитивным и негативным контролями (без фермента или без ABC (см. далее) соответственно).

Реакцию останавливали добавлением 200 мкл на ячейку 6 М гуанидина-HCl, после чего трижды промывали раствором (300 мкл на ячейку): PBS, 2 М NaCl, 50 мМ $MgSO_4$, 0,05% детергент Твин 20 (буфер В). Набор для комплекса авидин-биотин (ABC) (Vector Labs, Burlingame, CA) готовили в 10 мл PBS, содержащего 0,1% детергент Твин 20, который предварительно инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Добавляли раствор ABC (100 мкл на ячейку) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали 5 раз буфером В, затем добавляли раствор субстрата о-фенилендиамина (ОФД) (100 мкл на ячейку), который получали растворением одной таблетки 10 мг ОФД в 0,1 М буфере цитрат-PO_4, pH 5,3 и добавляя 7,5 мкл 30% H_2O_2. Планшет инкубировали в темноте в течение 10-15 мин, затем считывали показания в устройстве для считывания планшетов ELISA (Titertek Multiscan PLUS; ICN), используя фильтр с полосой 492 нм. Прибор был сопряжён с компьютером, где использовалась программа для считывания планшетов Delta Soft II от фирмы Biometallics (Princeton, NJ). Стандартную кривую получали для бычьей тестикулярной гиалуронидазы с помощью четырехпараметрического построения кривой, а неизвестные пробы интерполировали по их поглощению при 492 нм.

Для анализа зависимости активности гиауронидаз от pH использовали очищенный рекомбинантный sHASEGP и бычью тестикулярную гиалуронидазу. Зависимость ферментативной активности от pH определяли, разбавляя очищенный sHASEGP или частично очищенную бычью тестикулярную гиалуронидазу до 0,1 rTRU в следующих буферах: 50 мМ формиат, pH 3-4,5; 50 мМ ацетат, pH 5-6; 50 мМ MES, pH 6-7; или 50 мМ HEPES, pH 7-8. Пробы анализировали в течение 30 мин при 37°С и активность выражали в процентах от максимальной активности. NaCl в буферах не использовали, так как он может изменять pH-оптимум препаратов тестикулярной гиалуронидазы (Gold //Biochem. J. 1982, v. 205, p. 69-74; Gacesa et al. //Biochem. Soc. Trans. 1979, v. 7, p. 1287-1289). Физиологические концентрации соли (0,15 М) снижают кажущийся pH-оптимум, этот эффект более выражен у очищенных препаратов тестикулярного фермента, чем у исходного неочищенного образца.

b. Результаты.

Гиалуронан был биотинилирован в одноступенчатой реакции с помощью биотин-гидразида и EDAC. Путём ограничения количества EDAC, который связывает свободные карбоксильные группы на ГУ с биотин-гидразидом, была помечена лишь малая часть всех остатков глюкуроновой кислоты в ГУ. Это количество EDAC (3×10^{-5} М), добавленного к ГУ ($2{,}8\times10^{-3}$ М), обеспечило пришивку максимум 1 молекулы биотин-гидразида на 93 дисахаридных единицы ГУ.

По измеренным при pH 3,7 стандартным реакциям для бычьей тестикулярной гиалуронидазы, разбавленной до количеств от 1,0 до 1×10^{-6} TRU на ячейку, получена четырехпараметрическая аппроксимация кривой.

Четырёхпараметрические приближения были установлены из уравнения

$$y = [(A-D)/(1+(conc/C)^B)]+D,$$

где $\log_{it}y = \ln(y'/1-y')$, $y' = (y-D)/(A-D)$,

$B = -b/\ln 10$,

$C = \exp(A/B)$.

Четыре параметра (A, B, C, D) были рассчитаны с помощью компьютерной программы, использующей алгоритм 2+2 с линейной регрессией (Rodbard et al. //Clin. Chem. 1976, v. 22, p. 350). В этой аппроксимации учтён сигмоидный характер стандартной кривой. Оптимальная точность измерения активности образца обычно получается при количестве фермента от 0,001 до 0,01 TRU на ячейку и инкубации в течение 30 мин. При инкубации в течение 60 мин можно определить 1/1000 TRU. Для установления аппроксимации стандартной кривой можно для более короткого интервала значений использовать стандартную логарифмическую кривую. Хотя данное изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными примерами осуществления, следует понимать, что изобретение, как оно заявлено, не следует ошибочно ограничивать этими конкретными примерами.

Пример 2. Клонирование кДНК sHASEGP.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую sHASEGP, специалисты в данной области могут получить большим числом способов, включающих (но не ограниченных ими) синтез искусственного гена, ОТ-ПЦР и гибридизацию с библиотекой кДНК (для примера см. Gmachl et al. //FEBS Lett. 1993, v. 336, № 3; Kimmel et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993, v. 90, p. 10071-10075). В качестве альтернативы кодирующие человеческий sHASEGP можно получить от IMAGE или других поставщиков последовательностей генов человека (Invitrogen Clone, ID IOH10647).

Было вычислено, что кДНК для PH20 человека полной длины имеет длину 2009 нуклеотидов и содержит открытую рамку считывания длиной 1530 нуклеотидов. 5'UTR (5' нетранслируемая область) необычно велика, что может указывать на сохранённый интрон и может ингибировать трансляцию, препятствуя связыванию рибосомы с правильным метиониновым инициирующим кодоном из-за наличия в 5'UTR 9 некодирующих стартовых кодонов. Предсказано, что белок (Genbank, номер доступа NP 003108) содержит 509 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 1 с расчётной молекулярной массой 58 кДа.

Для секвенирования клонов вырезали амплифицированные в ПЦР зоны, элюировали их набором реагентов Gel Extraction Kit (Quiagen) и клонировали в подходящие векторы с совместимыми концами, полученными после расщепления рестриктазами. Все реакции секвенирования проводили на двунитевой ДНК с помощью набора для секвенирования с полимеразой Taq и обрывом цикла с красителем на дезокси-конце (Applied Biosystems), в соответствии с инструкциями производителя. Затем пробы помещали в автоматический секвенатор ABI Prism™ (Applied Biosystems).

Открытую рамку считывания PH20 человека получали, амплифицируя библиотеку кДНК из яичек человека (Clontech, Palo Alto, CA) в ПЦР с праймерами последовательностей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 47. Продукты ПЦР расщепляли рестриктазами NheI и BamHI и клонировали в сайты NheI и BamHI вектора IRESpuro2 (Clontech).

Пример 3. Выделение sHASEGP из кДНК гена PH20 человека.

Экспрессирующий вектор для получения каталитически активного секретируемого рекомбинантного человеческого sHASEGP с возможностью его эффективного гликозилирования в клетках млекопитающих был создан, как описано ниже. Рассматриваются также другие экспрессирующие конструкции с промоторами и селектирующими генами для клеток различных видов, таких как клетки дрожжей и насекомых, также способные производить sHASEGP. Гены для позитивной селекции, такие как гены глутамин-синтазы или дигидрофолат-редуктазы (ДГФР, DHFR), также могут быть использованы. Приводимые далее примеры не предназначены для ограничения, но скорее служат примером некоторых плазмидных систем экспрессии, которые могут быть использованы.

Для того чтобы сконструировать секретируемые формы sHASEGP, были сконструированы усечённые мутанты, лишённые гидрофобного С-концевого участка. С помощью программы, предсказывающей расщепление гликозилфосфатидилинозитола (GPI), в белке полной длины с заякориванием GPI был помещён вблизи аминокислотной позиции N483 сайт расщепления якоря GPI. Набор из семи гнездовых 3' праймеров был использован для конструирования набора из семи усечённых делеционных мутантов, утративших предсказанный сайт заякоривания GPI, начинающийся в положении Y482 и делетированный дальше на одну аминокислоту. Эти праймеры были сконструированы таким образом, чтобы иметь совместимые сайты NheI (5') и BamHI (3") для клонирования усечённых мутантов в вектор IRESpuro2 либо с отменённой меткой стоп-кодона в 3' праймере, либо с меткой His на С-конце белка для облегчения его очистки и детектирования. Например, обратные праймеры с последовательностями SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 были использованы для создания делеционных мутантов, оканчивающихся в позициях Y482, F481 и I480 без метки из 6 остатков His. Другие мутантные праймеры были созданы с тем же самым конструированием нуклеотидов, с соответствующими модификациями для вставления и исключения определённых аминокислот. Для создания помеченных His-вариантов использован тот же набор праймеров, что и для вариантов без меток, за тем исключением, что соответствующие обратные

праймеры были без стоп-кодона, а прямой праймер оставался тем же самым для конструкций с меткой His (это относится к праймерам с последовательностями SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, которые являются обратными праймерами без стоп-кодона, соответствующими немеченым обратным праймерам для соответствующих им конструкций). Для конструирования мостика из 6 аминокислот, следующего за гексагистидином между сайтами BamHI и NotI в векторе IRESpuro2, были использованы перекрывающиеся праймеры, так что мутанты с меткой His получались лигированием амплифицированных ПЦР и расщеплённых рестриктазами продуктов в сайты NheI и BamHI в содержащем последовательность для метки His векторе IRESpuro2.

Для того чтобы идентифицировать, может ли человеческий sHASEGP быть модифицирован на его карбоксильном конце для получения секретируемого фермента, активного в нейтральных условиях, между сайтом прикрепления якоря GPI и предсказанным «каталитическим доменом» была произведена серия усечений с учётом гомологии с ферментом из пчелиного яда.

В качестве матрицы для создания различных усечённых делеционных мутантов был использован клон в векторе IRESpuro2 ДНК, кодирующий человеческий sHASEGP полной длины с заякоренным GPI. Компьютерные программы моделирования дали для полипептида полной длины несколько предсказанных сайтов расщепления. Один из таких предсказанных сайтов - это аминокислотная позиция N483 (последовательность SEQ ID NO: 1). Были сконструированы ПЦР праймеры для последовательного усечения белка с N483, чтобы получить 6 делеционных мутантов, начиная с Y482 (утрата N) и кончая в E477 (утрата P).

a. Протокол.

Создание усечённого мутанта, лишённого N483.

В качестве матрицы был использован клон sHASEGP полной длины с заякоренным GPI между сайтами NheI и BamHI в плазмиде IRESpuro2. Эту матрицу амплифицировали с 5' праймером, содержащим сайт NheI, который начинался у стартового метионинового кодона для нативного сигнального пептида в M1 (последовательность SEQ ID NO: 14), и 3' праймер, содержащий сайт BamHI, оканчивающийся у Y482 (последовательность SEQ ID NO: 8). Продукт ПЦР подвергали электрофорезу в геле 1% агарозы, чтобы выделить и подтвердить наличие зоны амплифицированного продукта точного размера, очищали его, расщепляли рестриктазами NheI и BamHI и клонировали в вектор IRESpuro2 (Clontech) между сайтами NheI и BamHI, получая экспрессирующий вектор для экспрессии этого усечённого мутанта sHASEGP, оканчивающегося аминокислотой в положении N483 и утратившего заякоривание GPI, с указанными аминокислотной последовательностью (последовательность SEQ ID NO: 5 для последовательности полученного полипептида sHASEGP до аминокислоты Y482) и нуклеотидной последовательностью (последовательность SEQ ID NO: 48 - кодирующие нуклеотиды для полипептида с последовательностью SEQ ID NO: 5), как указано.

Создание других усечённых мутантов, утративших соответственно Y482, F481,I480, Q479 и P478

Была использована та же самая стратегия с единственным отличием: для каждого мутанта был взят соответствующий 3' праймер. Соответствующими 3' праймерами являются следующие:

3' праймер для мутанта sHASEGP, лишённого Y482, - последовательность SEQ ID NO: 9;

3' праймер для мутанта, лишённого F481, - последовательность SEQ ID NO: 10;

3' праймер для мутанта, лишённого I480, - последовательность SEQ ID NO: 11;

3' праймер для мутанта, лишённого Q479, - последовательность SEQ ID NO: 12;

3' праймер для мутанта, лишённого P478, - последовательность SEQ ID NO: 13.

Создание дальнейших делеционных мутантов для определения минимального активного домена sHASEGP.

Дополнительные делеции, блоками от 10 до 20 аминокислот, были произведены с 3'-конца самого активного при нейтральном pH усечённого мутанта sHASEGP, который представляет собой sHASEGP вплоть до E477. Прямой праймер с сайтом NheI (последовательность SEQ ID NO: 14) был взят вместе с соответственно позиционированным 3'-праймером для ПЦР-амплификации делеционного мутанта sHASEGP необходимой длины от карбоксильного конца. Например, ПЦР с праймерами, описанными в последовательностях SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 26 как соответственно 5'- и 3'-праймеры, была применена для получения при экспрессии с экспрессирующей конструкции в векторе IRESpuro2. Подобным же образом ПЦР с обратными 3' праймерами, описанными последовательностями SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32, была применена для создания делеционных мутантов, заканчивающихся соответственно у аминокислотных позиций A447, S430, G413, S394, A372 и S347 зрелого sHASEGP. В каждом случае ПЦР-продукты расщепляли ферментами NheI и BamHI и расщеплённый продукт клонировали в вектор pIRESpuro2 между сайтами NheI и BamHI. Несколько независимых клонов в конечной эспрессирующей конструкции из каждой группы тестировали на секрецию активного в нейтральных условиях sHASEGP путём преходящей трансфекции клеток CHO в среде CD-CHO без сыворотки (Invitrogen, CA); в указанные моменты времени отбирали пробы для анализа. Miniprep ДНК, полученную из ночных культур, трансфицировали с реагентом для трансфекции Genejuice (Novagen, CA), следуя рекомендованной производителем прописи. Активность

гиалуронидазы измеряли методом микротитрования, как описано выше.

b. Результаты.

Гиалуронидазную активность измеряли у усечённых мутантов sHASEGP, чтобы идентифицировать минимальный активный домен для секретируемой активной в нейтральных условиях гиалуронидазы (табл. 5).

Таблица 5

Аминокислоты с 1 по:	Ед./мл/24 ч при pH 7,4
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

Эти результаты показывают, что все 6 мутантов с делецией аминокислот, оканчивающихся указанной аминокислотой с Y482 по E477, дают секрецию с более высокой активностью, чем sHASEGP с заякориванием GPI.

Результаты показывают также, что делеции за аминокислотой A467 ликвидируют секретируемую активность полностью. Секретируемая активность в нейтральных условиях у клонов A467 снижалась приблизительно до 10% от активности, обнаруженной у клонов P478 или N483. Поэтому было сделано заключение, что более значительная часть карбоксильного концевого домена человеческого sHASEGP нужна для получения гиалуронидазного домена с активностью в нейтральных условиях, чем ранее предполагалось на основании данных для фермента пчелиного яда. Таким образом, цистеины в карбоксильном концевом домене необходимы для нейтральной активности. Поэтому минимальный активный домен определяется очень узкой протяжённостью, длиной приблизительно 10 аминокислот, перед сайтом отщепления GPI, начинающегося с N483.

Пример 4. Влияние модификаций сигнального пептида на секреторную активность sHASEGP.

Человеческий sHASEGP имеет необычно длинный предсказанный нативный лидерный пептид. Кроме того, наличие в лидерном пептиде двух соседствующих остатков цистеина может приводить при высоком уровне экспрессии к агрегации мультимеров полипептида внутри эндоплазматического ретикулума и вследствие этого препятствовать высокому уровню экспрессии sHASEGP. Поэтому испытывали набор более эффективных обеспечивающих секрецию лидерных пептидов с целью оценить их способность усиливать понуждение sHASEGP к секреции.

a. Протокол.

Каппа-лидирующий пептид конструировали путём гибридизации перекрывающихся праймеров и осуществления ПЦР с праймерами, соответствующими последовательностям SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40. Полученную последовательность Каппа, амплифицированную в ПЦР, амплифицировали с фланкирующими праймерами, содержащими сайт NheI на 5'-конце (как описано в последовательности SEQ ID NO: 41) и сайт EcoRI на 3'-конце (как описано в последовательности SEQ ID NO: 42). Это позволило клонировать лидирующий пептид Каппа (полипептидная последовательность описана в последовательности SEQ ID NO: 43) в вектор Litmus 39 (NEB) между сайтами NheI и EcoRI. sHASEGP имеет внутренний сайт EcoRI, поэтому эту конструкцию Каппа между сайтами NheI и EcoRI дополнительно амплифицировали с содержащим SpeI 5'-праймером (описанным в последовательности SEQ ID NO: 44) и содержащим MluI 3'-праймером (описанным в последовательности SEQ ID NO: 45). Последовательность для sHASEGP без сайта заякоривания GPI, заканчивающегося аминокислотой P478, вырезали из pIRESpuro2 рестриктазами NheI и EcoRI и клонировали в вектор Litmus 39 (NEB) между сайтами NheI и BamHI вектора Litmus 39. Полученный таким образом вектор Litmus, содержащий последовательность для sHASEGP, расщепляли рестриктазами SpeI и MluI и клонировали в него конструкцию для лидера Каппа, амплифицированную между SpeI и MluI. На этом векторе Litmus 39, содержащем последовательности и Каппа, и sHASEGP, проводили сайт-направленный мутагенез, чтобы создать единую рамку считывания для слитой последовательности для лидера Каппа со зрелым полипептидом sHASEGP. Пары праймеров, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 34

и SEQ ID NO: 35, использовали для создания лидера Каппа с нативным Asp в качестве оконечной аминокислоты, слитого с F38 полипептида sHASEGP (до аминокислоты P478) (как описано в последовательности SEQ ID NO: 46 для полипептидной последовательности слитого белка). Другая комбинация пары праймеров, такая как осуществлена последовательностями SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35, была использована для создания лидера Каппа, оканчивающегося Asp (D), слитого с L36 sHASEGP; последовательности SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 36 были использованы для создания лидера Каппа, заканчивающегося аминокислотой Gly (G) (перед оконечным Asp (D)), слитого с L36 sHASEGP; и последовательности SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36 были использованы для создания лидера Каппа, заканчивающегося аминокислотой Gly (G) (перед оконечным Asp (D)), слитого с F38 sHASEGP. Слияния Каппа-sHASEGP, полученные сайт-направленным мутагенезом, были очищены электрофорезом в геле, расщеплены ферментом DpnI, чтобы удалить всю перенесённую родительскую ДНК, а затем расщеплены рестриктазами NheI и BamHI и клонированы в расщеплённый NheI/BamHI остов HisIRESpuro2, имеющего гистидиновую метку (мостик из 6 аминокислот, за которыми следуют 6 гистидинов), клонированный между сайтами BamHI и NotI в вектор pIRESpuro2. Были получены 4 набора такой конструкции, которые соответствуют комбинациям G или D на конце лидера Каппа и L36 или F38 в начале зрелого sHASEGP. Для каждого типа конструкции несколькими независимыми клонами были трансфицированы клетки CHO в среде CD-CHO (Invitrogen, CA), чтобы проверить, способствует ли наличие лидера секреции Каппа повышенным уровням секреции белка в сравнении с действием нативного лидера секреции. Miniprep ДНК, полученную из ночных культур, трансфицировали с реагентом для трансфекции Genejuice (Novagen, CA), следуя рекомендованной производителем прописи, и в указанные выше моменты времени отбирали пробы для тестирования активности методом микротитрования. Активность гиалуронидазы измеряли методом микротитрования, как описано выше.

Были испытаны слитые конструкции лидерного пептида Каппа-цепи мышиного IgG с sHASEGP для проверки высоких уровней активности секретированного sHASEGP.

b. Результаты.

Таблица 6

Генная конструкция с sHASEGP человека	Ед./мл/24 ч при pH 7,4
Лидер IgG Каппа–sHASEGP, а.к. 38–478, His 6	3,0257
Нативный лидер–sHASEGP, а.к. 1–478, His 6	0,4857

Анализ активности фермента показал, что лидер IgG Каппа способен усиливать секрецию sHASEGP приблизительно в 7-8 раз по сравнению с нативным лидером секреции, если сравнивать с клонами P478, Y482 или N483, у которых нет такого лидера. Другие конструкции с лидером Каппа с вариациями места слияния с лидером в результате комбинаций Asp или Gly лидера Каппа с L36 или F38 sHASEGP также дали повышенные уровни секреции активной гиалуронидазы с нейтральной активностью. Назначение этих примеров - расширить, но не ограничить область охвата настоящего изобретения, и с применением такой же технологии могут быть использованы другие эффективные последовательности лидера секреции.

Пример 5. Создание экспрессирующего вектора для sHASEGP человека.

Последовательность для sHASEGP без эпитопной метки создавали клонированием в бицистронную экспрессирующую кассету HZ24 (последовательность SEQ ID NO: 47). Плазмидный вектор HZ24 для экспрессии sHASEGP содержит векторный скелет pCI (Promega), последовательность ДНК, кодирующую аминокислоты 1-482 гиалуронидазы PH20 человека, внутренний сайт вхождения в рибосому (internal ribosome entry site, IRES) из вируса цитомегаловируса лошадей ECMV (Clontech) и мышиный ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR). Скелет вектора pCI включает также ДНК, содержащую ген устойчивости к бета-лактамату (AmpR), начало репликации f1, непосредственно раннюю область энхансера/промотора цитомегаловируса (CMV), химерный интрон и сигнал позднего полиаденилирования вируса SV40 (SV40). ДНК, кодирующая конструкцию с sHASEGP, содержала консенсусную последовательность Kozack перед метионином нативного сигнального лидера и стоп-кодон возле тирозина-482. Полученная в итоге конструкция pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24) давала одну мРНК, синтез которой запускался промотором CMV, кодирующую аминокислоты 1-482 PH20 и аминокислоты 1-187 дигидрофолат-редуктазы, разделённые внутренним сайтом вхождения в рибосому.

Открытую рамку считывания PH20 человека амплифицировали из клона Invitrogen ORF (IOH10647, Invitrogen, Carlsbad, CA) с 5'-праймером, который вводил сайт NheI и консенсусную последовательность Kozack перед метионином PH20, и обратным праймером, который вводил стоп-кодон после тирозина-482 и сайт рестрикции BamHI. Полученный в итоге ПЦР-продукт вшивали лигазой в плазмиду pIRESpuro2 (Clontech, Palo Alto, CA) с последующим расщеплением ПЦР-фрагмента PH20 рестриктазами NheI и BamHI.

Пример 6. Создание линии клеток, экспрессирующих sHASEGP.

Нетрансфицированные клетки DG44 CHO, выращенные в модифицированной среде CD-CHO фирмы GIBCO для клеток DGFR(-), дополненной 4 мМ глутамином и 18 мл Plurionic F68/L (GIBCO), были

при приготовлении к трансфекции высеяны во встряхиваемый флакон в количестве $0,5\times10^6$ кл./мл. Клетки выращивали при 37°C в термостате с увлажнением в атмосфере 5% CO_2 и встряхиванием при скорости 120 об/мин. Перед трансфекцией у экспоненциально растущих нетрансфицированных клеток DG44 CHO проверяли жизнеспособность.

60 млн жизнеспособных клеток культуры нетрансфицированных клеток DG44 CHO осаждали центрифугированием и ресуспендировали при плотности 20 млн клеток в 0,7 мл буфера для трансфекции двойной концентрации (2×HeBS=40 мМ HEPES, pH 7,0, 274 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,4 мМ Na_2HPO_4, 12 мМ декстроза). К каждой аликвоте ресуспендированных клеток добавляли 0,09 мл линейной плазмиды HZ24 (250 мкг) и растворы клетки/ДНК переносили при комнатной температуре в кюветы для электропорации BTX (Gentronics) с зазором 0,4 см. Негативный контроль электропорации проводили с клетками без добавления плазмидной ДНК. Смеси клетки/плазмида подвергали электропорации при разряде конденсатора 330 В и 960 мкФ или при 350 В и 960 мкФ.

После электропорации клетки удаляли из кюветы, переносили в 5 мл модифицированной среды CD-CHO для клеток DGFR(-), дополненной 4 мМ глутамином и 18 мл Plurionic F68/L (GIBCO), и давали расти в ячейках 6-ячеечного планшета для культур ткани без селекции в течение 2 дней при 37°C в термостате с увлажнением в атмосфере 5% CO_2.

Через 2 дня после электропорации из каждой ячейки отбирали по 0,5 мл среды для культур ткани и проводили определение гиалуронидазной активности.

Начальная гиалуронидазная активность трансфицированных HZ24 клеток DG44 CHO через 40 ч после трансфекции приведена в табл. 7.

Таблица 7

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

Клетки после трансфекции 2 (350 В) собирали из ячейки, где они культивировались, подсчитывали и разбавляли до 10000-20000 жизнеспособных клеток в 1 мл. В каждую из 5 ячеек (планшеты для культур ткани на 96 ячеек с круглым дном) вносили по аликвоте 0,1 мл суспензии клеток. В содержащие клетки ячейки добавляли по 0,1 мл среды CD-CHO (GIBCO), содержащей 4 мМ Glutamax-1, но без добавления гипоксантина и тимидина (конечный объём 0,2 мл).

Из 5 планшетов, где клетки росли без метотрексата, идентифицировали 10 клонов (табл. 8).

Таблица 8

Шифр планшет/ячейка	Относительная гиалуронидазная активность
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302
1E11	242
A1 (+) контроль	333
H12 (–) контроль	0

Шесть клонов HZ24 доводили до культуры и переносили как суспензии одиночных клеток во флаконы на встряхивающем устройстве. Клоны 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 и 4D10 высевали в планшеты для культур ткани на 96 ячеек с круглым дном, используя стратегию 2-мерного бесконечного разбавления. Разбавленные клоны растили на фоне 500 нетрансфицированных клеток DG44 CHO на ячейку, чтобы обеспечить в первые дни культивирования необходимые ростовые факторы. На каждый субклон делали 10 планшетов.

Клон 3D3 дал 24 видимых субклона. В надосадочных жидкостях 8 из 24 субклонов была измерена значительная гиалуронидазная активность (>50 ед./мл) и рост этих 8 субклонов расширяли во флаконах T-25 для культур ткани в присутствии 50 нМ метотрексата. Рост клона 3D3 50 нМ далее расширяли в присутствии 500 нМ метотрексата, получив клоны, продуцировавшие во флаконах со встряхиванием активность более 1000 ед./мл (клон 3D3 5M).

Пример 7. Продуцирование sHASEGP.

Флакон с 3D3 5M размораживали и рост клеток расширяли из флаконов T во вращаемые флаконы объёмом 1 л в среде CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) с добавлением 100 нМ метотрексата и Glutamax (Invitrogen). Из вращаемых флаконов клетки переносили в биореактор объёмом 5 л (Braun) при плотности инокуляции $4,0\times10^5$ жизнеспособных клеток в 1 мл. Параметрами были: установка температуры - 37°C, pH 7,2 (стартовая установка), с установкой значения растворённого кислорода 25% и потоком воздуха над культурой 0-100 $см^3$/мин. Через 168 ч добавляли 250 мл среды Feed №1 (CD CHO+50 г/л глюкоза). В момент времени 215 ч добавляли 250 мл среды Feed № 2 (CD CHO+50 г/л глюкоза+10 мМ бутират натрия), а в момент 264 ч добавляли 250 мл среды Feed №2. Этот процесс привёл к итоговой гиалуронидазной активности (продуктивности) 1600 ед./мл с максимальной плотностью клеток 6 млн клеток в 1 мл. Было обнаружено, что добавление бутирата натрия резко повышает продукцию sHASEGP на конечных стадиях процесса.

Рост 3D3-5M и продукция sHASEGP, реактор на 5 л показаны в табл. 9.

Таблица 9

Время, ч	Жизнеспособные клетки $x10^5$	Доля жизнеспособных кеток, %	Активность, Ед./мл	Объём, мл	Концентр. глюкозы	Добавка среды
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	250 мл Feed №
192	66,6	98	512	4750	370	
216	55,2	92	610	4750	573	250 мл Feed №2
240	53	88	710	5000	573	
264	49,8	84	852	5000	474	250 мл Feed №2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25,4	52	1676	5250	690	

Пример 8. Очистка sHASEGP.

Культуральную среду клона 3D3 осветляли глубинной фильтрацией и диафильтрацией с тангенциальным потоком в 10 мМ HEPES, pH 7,0. Затем растворимый HASEGP очищали последовательными стадиями хроматографии: ионообменной хроматографией на Q-сефарозе (Pharnacia), гидрофобной хроматографией на фенилсефарозе (Pharnacia), хроматографией на фенилборонате (Prometics) и оксиапатите (BioRad, Richmond, CA).

sHASEGP связывался с Q-сефарозой и элюировался при 400 мМ NaCl в том же буфере. Элюат разбавляли 2 М сульфатом аммония до конечной концентрации 500 мМ аниона SO_4^{2-} и пропускали через колонку с фенилсефарозой (с малой высотой набивки), после чего при тех же условиях проводили связывание на колонке с фенилборонатной смолой. sHASEGP элюировался с фенилсефарозы в HEPES pH 6,9 после промывки колонки при pH 9,0 50 мМ бицином без аниона SO_4. Элюат наносили на смолу керамического оксиапатита при pH 6,9 в 5 мМ PO_4, 1 мМ $CaCl_2$ и элюировали 80 мМ PO_4 pH 7,4 с 0,1 мМ $CaCl_2$.

Полученный очищенный sHASEGP имел удельную активность свыше 65 тыс. ед. USP на 1 мг белка, определённую способом микротурбидиметрии с референсным стандартом USP. Очищенный sHASEGP элюировался одним пиком в позиции между 24 и 26 мин с колонки со стирол-дивинилбензольной смолой 5RPC (Pharnacia) градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторацетате (ТФА) от 0,1% ТФА/H_2O до 0,1% ТФА/90% ацетонитрил/10% H_2Oи был при электрофорезе с SDS виден как одна широкая линия 61 кДа, которая превращалась в узкую линию 51 кДа после обработки PNGазой F. Секвенирование N-концевых аминокислот показало эффективное удаление лидерного пептида.

Последовательность N-концевых аминокислот биохимически очищенного sHASEGP приведена в табл. 10.

Таблица 10

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Теория	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
Обнаружено	–	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

Пример 9. Анализ полученного в клетках DG44 CHO гликозилирования sHASEGP.

Существуют противоречивые данные относительно того, необходимо ли гликозилирование sHASEGP из разных видов для его каталитической активности. Например, были опубликованы данные о том, что ферментативно активная гиалуронидаза пчелиного яда может синтезироваться в клетках, лишённых

аппарата гликозилирования, например, таких как клетки E. coli. Более того, обработка очищенной бычьей тестикулярной гиалуронидазы PNGазой не инактивировала ферментативную активность (Yamagata et al., 1997). В других исследованиях было отмечено, что активность утрачивается после дегликозилирования и дополнительно нужны дисульфидные связи.

Поскольку все указанные выше более ранние испытания проводились на неочищенных либо частично очищенных препаратах, не было очевидным, является ли утрата активности результатом воздействия на дегликозилированный фермент сопутствующих протеаз в неочищенных препаратах или же она отражает прямую функциональную связь между гликозилированием и каталитической активностью.

a. Протокол.

Для того чтобы определить, может ли функциональное гликозилирование с N-связью быть введённым в человеческий sHASEGP с помощью системы экспрессии на основе клеток CHO в условиях отсутствия белка, кодирующую человеческий sHASEGP-His6 кДНК экспрессировали в клетках CHO в химически определённой среде, используя бицистронную кассету IRESpuro. Клетки выращивали в течение 72 ч в среде CD CHO (Invitrogen/GIBCO), проводя затем концентрирование и диафильтрацию с тангенциальным потоком в модуле Pellicon TFF (Millipore) с мембранами с пределом отсечения 30 кДа. Среду в концентрате заменяли на 10 мМ HEPES pH 7,4 с 50 мМ NaCl. Затем диафильтрат наносили на плёночный сорбент ДЭАЭ-сефарозы и элюировали градиентом NaCl: 0-1 М NaCl на смоле FPLC (Pharmacia). Человеческий sHASEGP элюировался в интервале 10-30% NaCl. Основная часть фермента обнаруживалась в этих фракциях. Фермент из градиента 10-30% NaCl затем дополнительно очищали аффинной хроматографией на смоле IMAC, заряженной Ni. Человеческий sHASEGP элюировался со смолы IMAC после промывки 10 мМ имидазолом с 50 мМ ацетатом pH 5,0. Затем белок концентрировали и диализовали против 10 мМ HEPES pH 7,4. Было определено, что фермент с высокой степенью очистки обладает удельной активностью 97000 ед./мг белка в присутствии 1 мМ кальция и 1 мг/мл человеческого сывороточного альбумина (HAS) при анализе микротитрованием методом ELISA с биотинилированным субстратом.

Для того чтобы установить изменения относительной молекулярной массы белка, очищенный человеческий sHASEGP обрабатывали в течение ночи PNGазой или нейраминидазой с последующим электрофорезом в геле, электропереносом и анализом вестерн-блотов с помощью связанных с пероксидазой хрена моноклональных антител к His6 (Quiagen) и детектирования люминесценции ECL.

b. Результаты.

Анализ вестерн-блотированием показал, что продуцированный в клетках CHO человеческий sHASEGP чувствителен к обработке PNGазой. Относительная молекулярная масса человеческого sHASEGP свидетельствует, что белок в высокой степени гликозилирован. После полного расщепления в течение ночи PNGазой размер человеческого sHASEGP снижался, давая монодисперсный образец, подтверждая таким образом, что некоторую гетерогенность зоны до расщепления можно приписать наличию N-связанных сахарных остатков. Частичное расщепление PNGазой F дало набор промежуточных компонентов, сдвигающихся при электрофорезе относительно зоны необработанного sHASEGP, и этот сдвиг прогрессировал при увеличении времени обработки. Хотя в 7% геле зоны несколько размыты, можно видеть по меньшей мере 6 различных промежуточных изоформ.

Обработка sHASEGP нейраминидазой показала, что клетки CHO действительно способны синтезировать сиалированный человеческий sHASEGP. После обработки нейраминидазой и анализа вестерн-блотированием sHASEGP после электрофореза в 7% гелях обнаруживался сдвиг в подвижности полученного в клетках CHO человеческого рекомбинантного sHASEGP приблизительно на 1-3 кДа по сравнению с необработанным sHASEGP. Таким образом, это первое сообщение о продукции, по существу, сиалированного человеческого sHASEGP. Это очень важно и для стабильности, и для увеличения времени полужизни в сыворотке человеческого sHASEGP, поскольку нативный sHASEGP из спермы многих видов лишён сиалирования и не реагирует с лектинами, специфичными к сиаловой кислоте.

Пример 10. Анализ sHASEGP методом FACE.

Анализ олигосахаридов активного sHASEGP методом FACE позволяет быстро определять распределение каталитически активных sHASEGP.

Протокол.

Очищенную гиалуронидазу из клона 3D3 5M характеризовали с помощью метода профилирования N-связанных олигосахаридов (Prozyme) FACE®. Олигосахариды отщепляли из 128,7 мкг гликопротеина ферментативным расщеплением N-гликаназой (известной также как PNGаза), метили флуорофором ANTS и разделяли электрофорезом. Относительные положения олигосахаридных зон определяли путём прогона образца и его разбавлений параллельно с олигосахаридным стандартом, дающим «лестницу» зон, которая выражает расстояние миграции в единицах степени полимеризации (СП).

Результаты.

N-профиль образца гиалуронидазы состоит из 10 зон, из которых 6, идущих согласованно с зонами олигосахаридного стандарта G5-G12, имели интенсивности более 9%. Кроме того, зона, подвижность которой согласуется с подвижностью зоны G9 стандарта, имела наибольшую интенсивность, равную 35-46%.

Анализ олигосахаридов профилированием при гель-электрофорезе показан в табл. 11.

Таблица 11

Олигосахарид sHASEGP	Степень полимеризации	Доля общего количества, %
1	15,64	
2	13,68	
3	11,61	
4	10,04	
5	8,37	
6	7,32	
7	6,14	
8	5,57	
9	3,84	
10	3,26	

Пример 11. Зависимость ферментативной активности sHASEGP от N-связанного гликозилирования.

a. Протокол.

Образцы очищенного sHASEGP-His6 смешивали с буфером, содержащим нейраминидазу и PNGазу в присутствии и без 50 мМ октилглюкозида (ОГ) и выдерживали в течение ночи при 37°C. Полнота удаления олигосахаридов была проверена по сдвигу положения зоны при электрофорезе в геле, определённому вестерн-блотированием.

b. Результаты.

Таблица 12

Образец	Активность, ед./мл
Без обработки	22,01
Нейраминидаза ночь с 50 мМ ОГ	23,57
PNGаза ночь с 50 мМ ОГ	0,0
PNGаза ночь без ОГ	10,74

Пример 12. Активность sHASEGP по отношению к сульфированным и несульфированным гликозаминогликанам.

В дополнение к анализу на основе микротитрования с использованием ГУ субстратную специфичность sHASEGP по отношению к другим гликозаминогликанам и протеогликанам можно тестировать по изменению подвижности в геле при электрофорезе с использованием очищенных субстратов, чтобы определить активность sHASEGP по отношению к другим гликозаминогликанам. Многие анализы гиалуронидазной активности основывались на измерении продукции новых редуцирующих N-ацетиламиногрупп (Bonner and Cantey //Clin. Chim. Acta. 1966, v. 13, p. 746-752) или снижении вязкости (De Salegui et al. //Arch. Biochem. Biophys. 1967, v. 121, p. 548-554) или мутности (Dorfman and Ott //J. Biol. Chem. 1948, v. 172, p. 367). С очищенными субстратами все эти способы годятся для определения присутствия или отсутствия эндоглюкозамидазной активности.

a. Протокол.

Анализ изменения подвижности в геле.

Очищенные субстраты смешивали с рекомбинантным sHASEGP с целью анализа эндоглюкозидазной активности, которая приводит к повышению подвижности субстрата в геле. Хондроитин-сульфат A, Aggrecan и D были фирмы Calbiochem. Гиалуронан (из пупочного жгута человека), хондроитин-сульфат C, дерматан-сульфат и гепаран-сульфат получены из Calbiochem. Гиалуронан пупочного жгута человека получен из фирмы ICN. Каждый испытуемый субстрат разбавляли до концентрации 0,1 мг/мл. Пробы объёмом 10 мкл очищенного sHASEGP или культуральной жидкости клеток, экспрессирующих sHASEGP, смешивали с 90 мкл испытуемого субстрата в требуемом буфере и инкубировали в течение 3 ч при 37°C. По окончании инкубации пробы нейтрализовали буфером для образцов (трис-ЭДТА pH 8,0, Бромфенол голубой и глицерин) и проводили электрофорез в 15% полиакриламидных гелях.

Гликозаминогликаны выявляли окрашиванием гелей 0,5% альцианом голубым в 3% уксусной кислоте в течение ночи, после чего отмывку краски проводили в 7% уксусной кислоте. Степень деструкции определяли, сопоставляя подвижность субстрата в присутствии и в отсутствие фермента.

b. Результаты.

100 ед. sHASEGP-His6 в 10 мкл инкубировали с 90 мкл буфера с 10 мМ HEPES и 50 мкг/мл человеческого сывороточного альбумина, содержащего 10 мкг различных гликозаминогликанов и протеогликанов в течение 2 ч при 37°C. Электрофоретический анализ с последующим окрашиванием гелей альцианом голубым выявил увеличение сдвигов подвижности в сторону одиночных блоков у хондроитин-сульфата A, C и D, у аггрекана и гиалуронана, но не выявил ни у гепаран-сульфата, ни у хондроитин-сульфата B. В то время как нерасщеплённые гликозаминогликаны при электрофорезе располагаются

размазанным пятном в середине геля, у продуктов расщепления основная часть окраски альцианом голубым перемещается с фронтом, а малая часть материала располагается лесенкой с повышающейся СП.

Пример 13. Влияние ионов металлов на активацию sHASEGP.

Было установлено, что помимо необходимости гликозилирования для оптимальной ферментативной активности человеческий sHASEGP активируется до оптимальной ферментативной активности ещё и катионами. Было обнаружено, что в процессе очистки sHASEGP после последовательных хроматографических этапов имеет низкую удельную активность. Было найдено, что sHASEGP с меткой His6 имеет очень низкую удельную активность, когда он очищен до гомогенности на ДЭАЭ-сефарозе и затем в этапах очистки Ni-IMAC. Поскольку смолы IMAC могут связывать клешневидными (хелатными) связями ионы металлов, различные ионы металлов вновь добавляли к sHASEGP, чтобы после этого определить относительную ферментативную активность.

a. Протокол.

Тестировали активность очищенного sHASEGP после инкубации с 0,1 мМ солями никеля (Ni), кобальта (Co), цинка (Zn), кальция (Ca) и магния (Mg) в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим определением гиалуронидазной активности в анализе на основе микротитрования.

b. Результаты.

Таблица 13

Добавка соли металла	Нейтральная активность, ед./мл
Без добавок	11,909
100 мкМ Ni	6,0306
100 мкМ Co	8,972
100 мкМ Zn	3,7476
100 мкМ Ca	101,9892

Было установлено значительное повышение гиалуронидазной активности после инкубации sHASEGP с 0,1 мМ кальция или 0,1 мМ магния. После инкубации с другими металлами такая активация не наблюдалась. Добавление кальция к sHASEGP повышало удельную активность фермента до приблизительно 97000 ед. на 1 мг белка, концентрацию которого определяли по оптической плотности при 280 нм. Затем определяли дозовую зависимость активности от концентрации ионов металлов кальция и магния, чтобы установить оптимальную для фермента концентрацию ионов металлов.

Таблица 14

Концентрация иона двухвалентного металла, мМ	$[Ca^{++}]$	$[Mg^{++}]$
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

Было установлено, что активация sHASEGP происходит в микромолярном интервале концентраций. Концентрации и кальция, и магния выше 10 мМ оказались ингибирующими. Для того чтобы исключить неспецифическую активацию субстрата, а не фермента, хлористый кальций в буфере 10 мМ HEPES инкубировали с биотинилированным субстратом, иммобилизованным в планшете для микротитрований, затем отмывали. Когда фермент добавляли к преинкубированному с кальцием и затем к отмытому планшету, никакой активации не наблюдалось. Активацию проверяли также на нативном sHASEGP, высвобожденном фосфолипазой C. Наблюдалась такая же активация кальцием, что исключило возможность искажения эпитопной метки His6.

Пример 14. Влияние альбумина на активность sHASEGP.

Было установлено, что при разбавлении рекомбинантной гиалуронидазы человека rHuPH20 и других препаратов тестикулярных гиалуронидаз со скотобоен для оптимальной активности необходимо добавление не только кальция, но и альбумина.

a. Протокол.

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) фирмы ICN разбавляли в 10 мМ буфере HEPES с

кальцием, чтобы определить влияние белка альбумина на ферментативную активность. Определения ферментативной активности sHASEGP и коммерческих препаратов проводили в присутствии 1 мМ $CaCl_2$ и 1 мг/мл ЧСА.

b. Результаты.

При больших разбавлениях в присутствии альбумина было обнаружено повышение активности гиалуронидазы. Неясно, является ли эта активация результатом предотвращения денатурации фермента, или же альбумин влияет на доступность субстрата. Таким образом, предпочтительная композиция с человеческим sHASEGP может включать альбумин и соль металла - кальция или магния.

Пример 15. Распространение активности очищенного sHASEGP in vivo.

a. Протокол.

Очищенный sHASEGP в 10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Pluronic разбавляли до 0,5 ед./мкл в апирогенной воде с 0,15 М NaCl. Делали серийные разбавления в физиологическом солевом растворе (конечный объём разбавлений составлял 20 мкл), получая дозы 0,01, 0,05, 0,1 ед. на инъекцию. Добавляли 20 мкл раствора трипанового голубого до конечного объёма 40 мкл и проводили подкожную инъекцию в каждый бок мышей $Balb^{Nu/Nu}$, которых перед этим анестезировали введением в/б смеси кетамин/ксилазин. С помощью микрометра измеряли в 2 направлениях размер областей распространения красителя с временем от 0 до 45 мин. Площадь областей выражали в квадратных миллиметрах. В качестве контроля включали рекомбинантную человеческую гиалуронидазу HYAL1, которая секретируется, но не обладает активностью в нейтральных условиях.

b. Результаты.

Таблица 15

Предмет испытания	Площадь красителя через 45 мин.
A. Солевой раствор (контроль)	51,5 мм^2
B. sHASEGP 0,01 ед.	76,8 мм^2
C. sHASEGP 0,05 ед.	98,22 мм^2
D. sHASEGP 0,10 ед.	180,4 мм^2
E. HYAL1 100 ед.	67,48 мм^2

Пример 16. Кинетика инактивации диффузионной активности sHASEGP.

a. Протокол.

Рекомбинантный очищенный sHASEGP-His6 разделяли на 2 аликвоты. Одну прогревали при 95°C в течение 15 мин в термоциклере с нагреваемой крышкой. Вторую оставляли при комнатной температуре. Термическую инактивацию ферментативной активности проверяли с помощью анализа активности на основе микротитрования. Для кинетического анализа тестировали инактивированный прогревом материал в сравнении с нативным. Четыре единицы очищенного sHASEGP или эквивалентное количество инактивированного прогревом материала инъецировали под кожу с красителем трипановым голубым. В различные моменты времени (вплоть до 15 мин) измеряли площадь распространения красителя.

b. Результаты.

Таблица 16

	Площадь распространения красителя, мм^2	
Время после инъекции, мин.	4 ед.	4 ед., инактивированные прогревом
t = 0	52,38	50,58
t = 3	116,51	65,48
t = 6,5	181,93	63,87
t = 10	216,96	65,80
t = 16	279,99	74,3

Пример 17. Восстановление кожного барьера, нарушенного sHASEGP.

a. Протокол.

Для того чтобы определить время регенерации пор, открытых sHASEGP после его подкожного введения, 2 ед. очищенного sHASEGP или контрольного солевого раствора вводили животным подкожной инъекцией в два расположенных на противоположных боках места в момент времени t=0, после чего в те же места вводили инъекцией трипановый голубой в моменты времени 30, 60 мин и 24 ч. Для каждого момента времени определяли в сравнении с контролем площадь диффузии красителя в момент t=15 мин после его инъекции.

b. Результаты.

Таблица 17

	Площадь распространения красителя, мм^2	
Время после инъекции sHASEGP	2 ед. sHASEGP	Солевой раствор (контроль)
0,5 ч	183	54
1 ч	167	50
22 ч	61	48

Результаты показывают, что кожный барьер восстанавливается в пределах 24 ч после введения 2 ед. фермента.

Пример 18. Определение размера каналов, открываемых sHASEGP.

Было установлено, что человеческий sHASEGP открывает каналы в интерстициальном пространстве, достаточные для обеспечения диффузии малых молекул, например красителя трипанового голубого. Однако оставалось неизвестным, каков верхний предел размера частиц, которые могут диффундировать в присутствии sHASEGP.

a. Протокол.

Для определения размера каналов, открываемых человеческим sHASEGP, были использованы флуоресцирующие молекулы различного размера. Декстраны с флуоресцентной меткой и средней молекулярной массой 4400 и 2 млн Да (Sigma), а также меченые флуоресцеином гранулы определённого диаметра от 20 до 500 нм (молекулярные зонды) вводили подкожно в объёме 40 мкл, после чего в те же места производили инъекцию sHASEGP или контрольного солевого раствора. Затем через 15 мин после инъекции измерениями в двух направлениях определяли площадь распространения окрашивания.

b. Результаты.

Таблица 18

Агент воздействия на диффузию	Размер частиц для тестирования диффузии	Площадь через 15 мин., мм^2	Стандартное отклонение
sHASEGP	4400 Да	84,2	25,7
Контроль	4400 Да	38,0	5,8
sHASEGP	2x106 Да	141,2	4,5
Контроль	2x106 Да	51,7	8,1
sHASEGP	Диаметр 20 нм	92,3	20,6
Контроль	Диаметр 20 нм	51,6	3,0
sHASEGP	Диаметр 100 нм	61,0	5,7
Контроль	Диаметр 100 нм	40,0	7,0
sHASEGP	Диаметр 200 нм	35,5	1,6
Контроль	Диаметр 200 нм	27,9	8,2
sHASEGP	Диаметр 500 нм	44,8	13,6
Контроль	Диаметр 500 нм	41,2	9,8

Результаты показывают, что после введения sHASEGP усиливается диффузия молекул размером от приблизительно 1 кДа (трипановый голубой) до 50 нм диаметром (гранулы латекса). В то время как кинетика диффузии бычьего сывороточного альбумина (66 кДа) подобна кинетике диффузии трипанового голубого, гранулам латекса диаметром 50 нм требуется для диффузии гораздо больше времени. Диффузия гранул диаметром 500 нм не обнаруживалась вплоть до 480 мин.

Пример 19. Профили сывороточной фармакокинетики биотнилированных антител после совместного подкожного введения человеческого sHASEGP.

a. Протокол.

Мышей-самок линии aBaIb/c анестезировали смесью кетамин/ксилазин. Затем мышам вводили подкожной инъекцией 20 мкл раствор с концентрацией 0,5 мг/мл биотинилированного мышиного IgG, смешанного с 20 мкл, или солевой раствор, либо sHASEGP с активностью 4 ед.

b. Результаты.

Таблица 19

	Содержание IgG в сыворотке	
Время после инъекции	Контроль	sHASEGP (4 ед.)
t = 0	0	0
t = 2 x	0	360 нг/мл
t = 51 x	4152 нг/мл	4176 нг/мл

Результаты показывают, что sHASEGP ускоряет кинетику проникновения в сыворотку больших молекул в кровотоке. В то время как в контрольной группе биотинилированный IgG в сыворотке через 2 ч не обнаруживается, в группе, в которой вводили sHASEGP, на момент 2 ч в сыворотке было 360 нг/мл IgG.

Пример 20. Активность распределения введённых подкожно молекул после внутривенной инъекции человеческого sHASEGP.

a. Протокол.

Для каждой дозы в каждом пункте испытаний и для контроля носителя использовали 4 места инъекции красителя. Инъекцию красителя производили через 45 мин после внутривенной инъекции препарата. Каждую дозу в пункте испытаний или контроля вводили в/в двум животным. Измерения и расчёты площади, охватываемой фронтом красителя через 45 мин после введения фермента, проводили для каждой дозы или контроля носителя через 2,5; 5; 10 и 15 мин.

b. Результаты.

Результаты показали, что высоко очищенный sHASEGP при внутривенном введении хорошо достигает в организме удалённых тканей. Активность распространения системно введённого sHASEGP зависит от дозы, причём данные для инъекции 10 ед. не отличаются от данных для контроля носителя.

Таблица 20

Тип	Доза в/в	Время, мин.	Средняя площадь, мм^2	Стандартное отклонение
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	11,11171
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
Контроль	0	2,5	34,652	5,935037
Контроль	0	5	36,279	3,614544
Контроль	0	10	44,687	5,821216
Контроль	0	15	53,002	2,812439

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. По существу, очищенный гликопротеин, содержащий растворимый гиалуронидазный полипептид PH-20, активный в нейтральных условиях, причем полипептид PH-20 усечён у С-концевого остатка в пределах 10 аминокислот от сайта отщепления эндогенного GPI (гликозилфосфатидил-инозитола) и содержит по меньшей мере один N-связанный фрагмент молекулы сахара, характеризующийся тем, что N-связанный фрагмент молекулы сахара ковалентно присоединен к остатку аспарагина полипептида.

2. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что полипептид выбран из:

а) полипептида, содержащего кодируемую нуклеотидной последовательностью последовательность аминокислот, которая имеет степень идентичности аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно 74% с последовательностью аминокислот 1-483, приведённой в последовательно-

сти SEQ ID NO: 1;

b) полипептида, содержащего последовательность аминокислот, кодируемую последовательностью нуклеотидов 1-1499, представленной в последовательности SEQ ID NO: 6;

c) полипептида, содержащего последовательность аминокислот, кодируемую последовательностью нуклеотидов, по меньшей мере 85% от полной длины которой гибридизируется при условиях высокой степени строгости, с последовательностью нуклеотидов, представленной как последовательность SEQ ID NO: 6, или

d) полипептида, кодируемого последовательностью нуклеотидов, которая является полученным при сплайсинге вариантом последовательности нуклеотидов, включающей последовательность, представленную как последовательность SEQ ID NO: 50.

3. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара ковалентно присоединен к остатку аспарагина, выбранному из аминокислот 82, 166, 235, 254, 368 или 393, указанных в последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара ковалентно присоединен к полипептиду связью, чувствительной к PNGазе.

5. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара относится к типу фрагментов молекулы сахара, содержащих большое количество маннозы.

6. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара относится к типу комплексов.

7. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара относится к типу гибридов.

8. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что фрагмент молекулы сахара дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент молекулы сахара, заканчивающийся сиаловой кислотой.

9. Гликопротеин по п.8, отличающийся тем, что полипептид сверхсиалирован.

10. Гликопротеин по п.9, отличающийся тем, что полипептид содержит последовательность аминокислот, представленную как аминокислоты 1-450 последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислоты 1-438 последовательности SEQ ID NO: 3 или аминокислоты 1-459 последовательности SEQ ID NO: 3.

11. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что он имеет степень идентичности последовательности, большую чем приблизительно 80% с полипептидом, содержащим последовательность аминокислот, приведённую в последовательности SEQ ID NO: 3, а также отличающийся тем, что полипептид представляет собой гиалуронидазу.

12. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что полипептид кодируется полинуклеотидом, по меньшей мере 70% полной длины которого гибридизируется при условиях высокой степени строгости с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеотидов, которая приведена в последовательности SEQ ID NO: 6, или по меньшей мере с одним её доменом либо с каталитически активной частью домена.

13. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что представляет собой гликопротеин человека.

14. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что полипептид представляет собой растворимый полипептид, представленный в последовательности SEQ ID NO: 4.

15. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что полипептид не содержит полной последовательности, приведённой в последовательности SEQ ID NO: 1, и включает, по меньшей мере, аминокислоты 1-429 последовательности SEQ ID NO: 4.

16. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что представляет собой мутеин (мутированный белок), причем приблизительно до 50% аминокислот полипептида замещены другими аминокислотами; при этом полученный полипептид (мутеин) имеет каталитическую активность, составляющую по меньшей мере 10% от активности немутированного полипептида.

17. Гликопротеин по п.16, отличающийся тем, что приблизительно до 10% аминокислот полипептида замещены другими аминокислотами.

18. Гликопротеин по п.16, отличающийся тем, что полученный полипептид (мутеин) имеет каталитическую активность, составляющую по меньшей мере 50% активности немутированного полипептида.

19. Гликопротеин по п.16, отличающийся тем, что свободный цистеин в гиалуронидазном домене замещён другой аминокислотой.

20. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что к полипептиду гликопротеина функционально присоединена сигнальная последовательность, способная направить полипептид из клетки наружу.

21. Изолированный растворимый гликопротеин гиалуронидазы PH-20 человека (sHASEGP), причем гликопротеин PH-20 усечён у С-концевого остатка в пределах 10 аминокислот от сайта отщепления эндогенного GPI, характеризующийся тем, что эффективность sHASEGP превышает 40000 единиц USP (ед.) на 1 мг белка.

22. sHASEGP по п.21, отличающийся тем, что гиалуронидаза сиалирована.

23. sHASEGP по п.21, отличающийся тем, что эффективность превышает приблизительно 45000, 55000, 60000, 80000, 90000, 95000 или 100000 ед./мг.

24. sHASEGP по п.21, отличающийся тем, что эффективность составляет приблизительно от 60000

до 80000 ед./мг.

25. Гликопротеин по п.1 или 21, отличающийся тем, что полипептид модифицирован полимером.

26. Гликопротеин по п.25, отличающийся тем, что полимер представляет собой ПЭГ или декстран.

27. Композиция, включающая гликопротеин, как он определен в п.21.

28. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид гликопротеина, как он определен в п.1.

29. Изолированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая растворимый гиалуронидазный полипептид PH-20, активный в нейтральных условиях, причем полипептид PH-20 усечён у С-концевого остатка в пределах 10 аминокислот от сайта отщепления эндогенного GPI, включающая последовательность, выбранную из:

a) полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность аминокислот, которая имеет степень идентичности аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно 74%, с последовательностью аминокислот 1-483, приведённой в последовательности SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотидной последовательности нуклеотидов 1-1499, представленной в последовательности SEQ ID NO: 6;

c) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере 85% от полной длины которой гибридизируется при условиях высокой степени строгости с последовательностью нуклеотидов, приведённой в последовательности SEQ ID NO: 6, или

(d) полипептида, кодируемого последовательностью нуклеотидов, которая является полученным при сплайсинге вариантом последовательности нуклеотидов, включающей последовательность, представленную как последовательность SEQ ID NO: 50.

30. Вектор, имеющий последовательность, представленную в последовательности SEQ ID NO: 51.

31. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, как она определена в п.29.

32. Вектор по п.31, отличающийся тем, что представляет собой экспрессирующий вектор.

33. Вектор по п.31, отличающийся тем, что представляет собой вектор эукариот.

34. Вектор по п.31, отличающийся тем, что включает последовательность нуклеотидов, которая направляет секрецию любого полипептида, кодируемого последовательностью нуклеотидов, функционально к ней присоединённой.

35. Вектор по п.31, отличающийся тем, что это вектор Pichia, вектор E. coli или вирусный вектор.

36. Изолированная клетка, содержащая вектор, как он определен в п.31.

37. Клетка по п.36, отличающаяся тем, что это прокариотическая или эукариотическая клетка.

38. Клетка по п.36, отличающаяся тем, что выбрана из бактериальной, дрожжевой, растительной клеток, из клетки насекомого или клетки животного.

39. Клетка по п.36, отличающаяся тем, что является клеткой млекопитающего.

40. Антитело, связывающееся с гликопротеином, как он определен в п.1, характеризующееся тем, что не обладает реактивностью по отношению к бычьей, овечьей или бактериальной гиалуронидазе.

41. Трансгенное животное, не являющееся человеком, отличающееся тем, что эндогенный ген, кодирующий полипептид гликопротеина, как он определен в п.1, был разрушен гомологичной рекомбинацией или мутагенезом по типу вставок у животного или его предка.

42. Способ получения растворимого полипептида, содержащего полипептид sHASEGP, включающий

введение нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид гликопротеина, как он определен в п.1, функционально присоединённой к подходящему промотору, в клетку, которая содержит в sHASEGP N-связанные фрагменты молекулы сахара;

культивирование клетки в условиях, при которых кодируемый полипептид экспрессируется клеткой, и

выделение экспрессированного полипептида.

43. Способ по п.42, отличающийся тем, что клетка представляет собой эукариотическую клетку.

44. Способ по п.43, отличающийся тем, что эукариотическая клетка выбрана из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой или растительной клеток.

45. Способ по п.44, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку CHO.

46. Способ получения растворимого полипептида, содержащего полипептид sHASEGP, включающий

культивирование клетки, как она определена в п.36, в условиях, при которых кодируемый полипептид экспрессируется клеткой, и

выделение экспрессированного полипептида.

47. Применение гликопротеина по п.1 в медицине.

48. Способ генной терапии ex vivo, включающий

введение in vitro нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин, как он определен в п.1, и функционально присоединённой к подходящему промотору, в клетку, не являющуюся клеткой человека, которая способна включать в sHASEGP N-связанные фрагменты молекулы сахара;

создание таким путём генетически модифицированной клетки, не являющейся клеткой человека,

содержащей нуклеиновую кислоту.

49. Способ получения овоцита млекопитающего, не являющегося человеком, для оплодотворения in vitro, включающий

приведение нечеловеческого овоцита в контакт с гликопротеином, как он определен в п.1, взятым в количестве, эффективном для удаления кумулюсного матрикса.

50. Способ по п.49, отличающийся тем, что кумулюс эффективно удаляют без применения пипетки с узким отверстием для манипулирования с овоцитом.

51. Способ получения гликопротеина, включающий приведение полипептида гликопротеина, как он определен в п.1, в контакт с гликозилтрансферазными ферментами, способными вводить N-связанные фрагменты молекулы сахара в полипептид, создавая таким путём гликопротеин, как он определен в п.1.

52. Способ по п.51, отличающийся тем, что гликозилтрансферазные ферменты получают из микросомных мембран псовых.

53. Композиция, содержащая, по существу, очищенный гликопротеин, как он определен в п.1, и подходящий фармацевтический носитель.

54. Применение гликопротеина, как он определен в п.1, в лечении избытка субстрата sHASEGP у индивидуума, включающего удаление субстрата sHASEGP.

55. Применение по п.54, отличающееся тем, что избыток субстрата продуцируется тканью рубцов.

56. Применение по п.55, отличающееся тем, что ткань рубцов представляет собой глиальные рубцы, возникшие вследствие повреждения спинного мозга.

57. Применение по п.55, отличающееся тем, что ткань рубцов представляет собой результат хирургической операции.

58. Применение по п.55, отличающееся тем, что ткань рубцов представляет собой келоидные рубцы.

59. Применение по п.58, отличающееся тем, что субстрат связан с образующим грыжу диском.

60. Применение гликопротеина, как он определен в п.1, для усиления у индивидуума диффузии терапевтического вещества с диаметром, меньшим чем приблизительно 0,5 мкм, включающее открытие или формирование у указанного индивидуума каналов с диаметром менее 0,5 мкм.

61. Применение по п.60, отличающееся тем, что гликопротеин вводят инъекцией в дозе от 0,1 до 1500 ед.

62. Применение по п.60, отличающееся тем, что полипептид гликопротеина смешивают с терапевтическим веществом до инъекции.

63. Комплект, содержащий:

a) гликопротеин по п.1 в дозе от 0,1 до 1500 ед./мл в приемлемом носителе;

b) по меньшей мере одно терапевтическое вещество в приемлемом носителе; и

(c) по усмотрению, инструкции по введению терапевтических веществ.

64. Комплект по п.63, отличающийся тем, что гликопротеин и терапевтическое вещество представляются в виде смеси.

65. Применение по п.47 для лечения сердечно-сосудистого расстройства, включающее удаление избытка гликозаминогликанов.

66. Применение по п.65, отличающееся тем, что сердечно-сосудистое расстройство выбрано из инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности или артериосклероза.

67. Применение по п.47 для лечения опухоли, включающее удаление избытка гликозаминогликанов.

68. Применение гликопротеина, как он определен в п.1, для доставки молекулы в ткань, содержащую избыточные количества гликозаминогликана, включающее разрушение гликозаминогликанов в степени, достаточной для открытия каналов диаметром менее чем приблизительно 500 нм.

69. Применение по п.68, отличающееся тем, что полипептид модифицирован полимером.

70. Применение по п.69, отличающееся тем, что полимер представляет собой ПЭГ или декстран.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая, по существу, очищенный гликопротеин, как он определен в п.1, и фармацевтический носитель.

72. Фармацевтическая композиция, содержащая, по существу, очищенный гликопротеин, как он определен в п.1.

73. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что полипептид в композиции использован в качестве вещества, распределяющего фармацевтически активное средство.

74. Фармацевтическая композиция по п.73, отличающаяся тем, что фармацевтически активное средство выбрано из группы средств, состоящей из химиотерапевтического, анальгезирующего, противовоспалительного, антимикробного, амёбоцидного, трихомоноцидного, антипаркинсонного, антималярийного, антиконвульсионного, антидепрессивного, противоартритного, противогрибкового, антигипертензивного, жаропонижающего, противопаразитного, антигистаминного, альфа-адренергического агониста, альфа-блокирующего, обезболивающего, бронхолитического, биоцидного, бактерицидного, бактериостатического, бета-адренергоблокирующего, блокирующего кальциевые каналы, сердечно-сосудистого лекарства, противозачаточного, противозастойного, мочегонного, депрессантного, диагно-

стического, электролитического, гипнотического, гормонального, гипергликемического, мышцерасслабляющего, мышцесокращающего, офтальмологического, парасимпатомиметического, тимолептического, седативного, симпатомиметического, транквилизатора, мочевого, вагинального, противовирусного, витаминного, нестероидного противовоспалительного и ингибирующего ангиотензинпреобразующий фермент средств, полипептида, белка, нуклеиновой кислоты, лекарства, органической молекулы или снотворного средства.

75. Фармацевтическая композиция по п.74, отличающаяся тем, что химиотерапевтическим средством является токсин или фактор некроза опухолей.

76. Фармацевтическая композиция по п.74, отличающаяся тем, что анестезирующим средством является лигнокаин или бупивикаин.

77. Фармацевтическая композиция по п.74, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит гормональное средство.

78. Фармацевтическая композиция по п.77, отличающаяся тем, что гормональным средством является эпинефрин.

79. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что фармацевтический носитель представляет собой стабилизирующий раствор.

80. Фармацевтическая композиция по п.79, отличающаяся тем, что стабилизирующий раствор содержит NaCl и металл, выбранный из $CaCl_2$ и $MgCl_2$.

81. Фармацевтическая композиция по п.79, отличающаяся тем, что стабилизирующий раствор дополнительно содержит этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

82. Фармацевтическая композиция по п.79, отличающаяся тем, что стабилизирующий раствор дополнительно содержит носитель, выбранный из группы, содержащей альбумин, детергент или поверхностно-активное вещество.

83. Фармацевтическая композиция по п.79, отличающаяся тем, что стабилизирующий раствор содержит фенол красный, человеческий сывороточный альбумин, HEPES, NaCl и металл, выбранный из $CaCl_2$ и $MgCl_2$.

84. Фармацевтическая композиция по п.83, отличающаяся тем, что концентрация гликопротеина составляет приблизительно 80 ед./мг.

85. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

86. Фармацевтическая композиция по п.85, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество выбрано из сорбитан-монолаурата; сорбитан-моноолеата; сорбитан-пальмитата; сорбитан-моностеарата; сорбитан-сесквитолата; сорбитан-триолеата; производных эфира полиоксиэтилен-олеиновой кислоты; производных полиоксиэтилен-лауриламина; производных полиоксиэтилен-стеариламина; производных полиоксиэтилен-олеиламина; полиоксиэтиленовых производных касторового масла; полиоксиэтиленовых производных гидрогенизированного касторового масла; полиоксиэтиленовых производных бис-фенольного эфира; полиоксиэтиленгликолей; сорбитановых производных эфиров жирных кислот; полиоксиэтиленовых производных эфиров жирных кислот; производных полиоксиэтилен-полиоксипропилена; полиэтиленгликоль-гексадецилового эфира (Brij® 56); полиэтиленгликоль-октадецилового эфира (Brij® 72); полиоксиэтилен-10 олеилового эфира (Brij® 97); трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанола (Тритон® X-100); полиэтиленгликоль-сорбитан-монолаурата (Твин® 20); полиоксиэтилен-сорбитан-монопальмитата (Твин® 40); полиэтиленгликоль-сорбитан-моностеарата (Твин® 60); полиоксиэтилен-сорбитан-тристеарата (Твин® 65); полиэтиленгликоль-сорбитан-моноолеата (Твин® 80); полиоксиэтилен-сорбитан-триолеата (Твин® 85); трис-(оксиметил)аминометан-лаурилсульфата (Тризма® додецилсульфат); блочного сополимера полиэтилен- и полипропиленгликолей (Плюроник® F68) или альбумина.

87. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что концентрация гликопротеина находится в интервале приблизительно 1-5000 ед./мг.

88. Фармацевтическая композиция по п.85, отличающаяся тем, что концентрация гликопротеина находится в интервале приблизительно 1-300 ед./мг.

89. Фармацевтическая композиция по п.85, отличающаяся тем, что концентрация гликопротеина находится в интервале приблизительно 1-150 ед./мг.

90. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что дополнительно содержит ион металла, выбранного из кальция и магния.

91. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что составлена для заданного высвобождения во времени или для высвобождения при контакте с местом введения или тканью-мишенью.

92. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что составлена для местного, локального, брюшного, парентерального, внутрицистного, внутрикожного, внутрь стекловидного тела, подкожного, внутримышечного или внутривенного введения.

93. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что составлена в виде спрея, пены или аэрозоля, таблетки или капсулы.

94. Фармацевтическая композиция по п.90, отличающаяся тем, что дополнительно содержит растворимое в кишечнике покрытие.

95. Фармацевтическая композиция по п.94, отличающаяся тем, что покрытие выбрано из фталата ацетата целлюлозы, полиэтиленгликоля, полиоксиэтилен-сорбитана, касторового масла, псевдолатекса этилцеллюлозы фенилсалицилата, н-бутилстеарата, стеариновой кислоты и карнаубского воска.

96. Фармацевтическая композиция по п.71, отличающаяся тем, что представляет собой лиофилизированный порошок.

97. Фармацевтическая композиция по п.96, отличающаяся тем, что лиофилизованный порошок получают способом, включающим:

a) перенесение фармацевтической композиции в буферный раствор;

b) стерильное фильтрование полученного раствора;

c) лиофильную сушку фильтрованного раствора при стандартных условиях, чтобы получить стерильный порошок.

98. Фармацевтическая композиция по п.97, отличающаяся тем, что буферный раствор выбран из HEPES, фосфата, цитрата и бикарбоната.

99. Фармацевтическая композиция по п.98, отличающаяся тем, что буферный раствор дополнительно содержит сахар или углевод.

100. Фармацевтическая композиция по п.99, отличающаяся тем, что сахар или углевод представляет собой декстрозу или лактозу.

101. Фармацевтическая композиция по п.100, отличающаяся тем, что лактоза присутствует в концентрации приблизительно 1-15 мг/мл.

102. Фармацевтическая композиция по п.97, отличающаяся тем, что буферный раствор дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

103. Фармацевтическая композиция по п.97, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество выбрано из сорбитан-монолаурата; сорбитан-моноолеата; сорбитан-пальмитата; сорбитан-моностеарата; сорбитан-сесквитолата; сорбитан-триолеата; производных эфира полиоксиэтилен-олеиновой кислоты; производных полиоксиэтилен-лауриламина; производных полиоксиэтилен-стеариламина; производных полиоксиэтилен-олеиламина; полиоксиэтиленовых производных касторового масла; полиоксиэтиленовых производных гидрогенизированного касторового масла; полиоксиэтиленовых производных бис-фенольного эфира; полиоксиэтиленгликолей; сорбитановых производных эфиров жирных кислот; полиоксиэтиленовых производных эфиров жирных кислот; производных полиоксиэтилен-полиоксипропилена; полиэтиленгликоль-гексадецилового эфира (Brij® 56); полиэтиленгликоль-октадецилового эфира (Brij® 72); полиоксиэтилен-10 олеилового эфира (Brij® 97); трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанола (Тритон® X-100); полиэтиленгликоль-сорбитан-монолаурата (Твин® 20); полиоксиэтилен-сорбитан-монопальмитата (Твин® 40); полиэтиленгликоль-сорбитан-моностеарата (Твин® 60); полиоксиэтилен-сорбитан-тристеарата (Твин® 65); полиэтиленгликоль-сорбитан-моноолеата (Твин® 80); полиоксиэтилен-сорбитан-триолеата (Твин® 85); трис(оксиметил)аминометан-лаурилсульфата (Тризма® додецилсульфат); блочного сополимера полиэтилен- и полипропиленгликолей (Плюроник® F68) или альбумина.

104. Набор, включающий стерильный флакон и фармацевтическую композицию, как она определена в п.71, характеризующийся тем, что композиция находится во флаконе.

105. Набор по п.104, отличающийся тем, что стерильный флакон содержит количество фармацевтической композиции, предназначенное для введения одной дозы.

106. Набор, включающий стерильный флакон, содержащий фармацевтическую композицию, как она определена в п.92.

107. Набор по п.104, отличающийся тем, что стерильный флакон дополнительно содержит необходимое для инъекции количество стерильной воды, и конечная концентрация гликопротеина составляет приблизительно 1-5000 ед./мл.

108. Набор, включающий стерильный шприц, содержащий фармацевтическую композицию, как она определена в п.71.

109. Набор по п.108, отличающийся тем, что стерильный шприц имеет объём приблизительно 5-50 мкл.

110. Набор по п.108, отличающийся тем, что конечная концентрация гликопротеина находится в интервале приблизительно 1-5000 ед./мл.

111. Набор, включающий стерильный шприц, содержащий фармацевтическую композицию, как она определена в п.92.

112. Набор по п.111, отличающийся тем, что конечная концентрация гликопротеина находится в интервале приблизительно 1-5000 ед./мл.

113. Набор по п.111, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция растворена в стерильной воде объёмом приблизительно 5-50 мкл.

114. Набор по п.111, отличающийся тем, что он дополнительно содержит второй шприц, содержа-

щий фармацевтически эффективное средство.

115. Набор по п.111, отличающийся тем, что фармацевтически эффективное средство выбрано из группы средств, состоящей из химиотерапевтического, анальгезирующего, противовоспалительного, антимикробного, амёбоцидного, трихомоноцидного, антипаркинсонного, антималярийного, антиконвульсионного, антидепрессивного, противоартритного, противогрибкового, антигипертензивного, жаропонижающего, противопаразитного, антигистаминного, альфа-адренергического агониста, альфа-блокирующего, обезболивающего, бронхолитического, биоцидного, бактерицидного, бактериостатического, бета-адренергоблокирующего, блокирующего кальциевые каналы, сердечно-сосудистого лекарства, противозачаточного, противозастойного, мочегонного, депрессантного, диагностического, электролитического, гипнотического, гормонального, гипергликемического, мышцерасслабляющего, мышцесокращающего, офтальмологического, парасимпатомиметического, тимолептического, седативного, симпатомиметического, транквилизатора, мочевого, вагинального, противовирусного, витаминного, нестероидного противовоспалительного, ингибирующего ангиотензин-преобразующий фермент средств, полипептида, белка, нуклеиновой кислоты, лекарства, органической молекулы или снотворного средства.

116. Набор по п.115, отличающийся тем, что фармацевтически эффективным средством является вязкоупругое вещество.

117. Комплект, содержащий набор, как он определен в п.104 или 111, и одно или более из следующего:

упаковочный материал и

инструкции по пользованию комплектом для применения фармацевтической композиции.

118. Комплект по п.117, отличающийся тем, что упаковочный материал включает лёд, сухой лёд, пенополистирол, пенопласт, пластмассу, целлофан, плотную обёртку, пупырчатую обёртку, бумагу, картон, арахисовый крахмал, скрученные стяжки, металлические скрепки, металлические контейнеры, осушители, стекло и резину.

119. Применение по п.47 для лечения патологического накопления гликозаминогликанов, причём гликопротеин не содержит бычьего, овечьего или бактериального ферментов и исправляет или снижает накопление гликозаминогликанов.

120. Применение по п.119, отличающееся тем, что накопление выбрано из сердечно-сосудистого, церебрального накопления, парафимоза, микседемы, склеромикседемы и лимфедемы.

121. Применение по п.47 для облегчения восстановления сосудов в некротической ткани, включающего введение и индуцирующее прорастание новых кровеносных сосудов в некротическую ткань.

122. Применение гликопротеина, как он определен в п.1, для удаления гликозаминогликанов из жидкой части стекловидного тела.

123. Гликопротеин по п.1, отличающийся тем, что N-связанный гликан имеет степень полимеризации, равную приблизительно 15,6; 13,7; 11,6; 10,0; 8,37; 7,32; 6,1; 5,6; 3,8 или 3,2.

124. Способ получения, по существу, очищенного растворимого гиалуронидазного полипептида PH-20, активного в нейтральных условиях, усечённого у С-концевого остатка в пределах 10 аминокислот от сайта отщепления эндогенного GPI, состоящий в выращивании клеток яичника китайского хомячка в подходящей ростовой среде и в присутствии 0,1-1 мМ бутирата натрия в условиях, подходящих для продуцирования полипептида.

125. Способ очистки гликопротеина по п.1, включающий

приведение содержащей sHASEGP среды при низкой ионной силе в контакт с анионообменной смолой при нейтральном pH;

элюирование sHASEGP солью с концентрацией приблизительно 400 мМ;

приведение sHASEGP в контакт со смолой для хроматографии с гидрофобным взаимодействием в присутствии приблизительно 0,5 М сульфата аммония;

приведение sHASEGP в сульфате аммония в контакт с фенилборонатной смолой;

элюирование sHASEGP в низкой концентрации соли при нейтральном pH;

приведение sHASEGP в контакт со смолой оксиапатитом;

элюирование sHASEGP фосфатом натрия с концентрацией приблизительно 100 мМ, что приводит в результате к получению sHASEGP, причём sHASEGP является, по существу, очищенным.

126. Применение по п.47 для лечения расстройства глаза млекопитающего посредством индукции разжижения жидкой части стекловидного тела.

127. Применение по п.126, отличающееся тем, что протеин модифицирован полимером.

128. Применение по п.127, отличающееся тем, что полимер представляет собой ПЭГ или декстран.

129. Применение человеческого sHASEGP для снижения внутриглазного давления в глазу индивидуума, включающее введение его нуждающемуся в этом субъекту, причем указанный человеческий sHASEGP характеризуется тем, что он

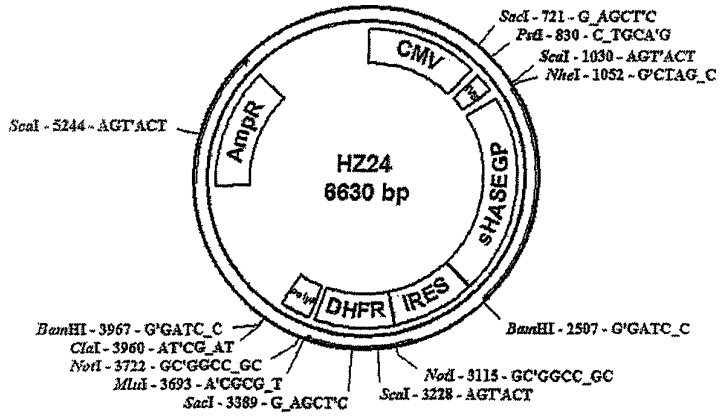
представляет собой полипептид PH-20, усечённый у С-концевого остатка в пределах 10 аминокислот от сайта отщепления эндогенного GPI;

по существу, не содержит бычьего, овечьего или бактериального ферментов;

имеет активность более 40000 единиц USP на 1 мг белка.

130. Применение по п.129, отличающееся тем, что человеческий sHASEGP дополнительно характеризуется тем, что не содержит IgG.

131. Применение гликопротеина, как он определен в п.1, в производстве медикамента для лечения сердечно-сосудистого расстройства, включающего инфаркт миокарда, застойную сердечную недостаточность и артериосклероз, накопления гликозаминогликанов, кровоизлияния в стекловидное тело, грыжи межпозвоночного диска, рака, внутриглазного давления и микседемы.



Перечень последовательностей

<110> HALOZYME, INC.
ХЭЛОЗИМ, ИНК.

<120> Растворимый гликопротеин гиалуронидазы (sHASEGP), способ его получения, применение и фармацевтическая композиция его содержащая

<130> DELIA1340WO

<150> PCT/US2004/006656
<151> 2004-03-05

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARBOHYD
<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 1

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

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

<210> 2
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr
        35
```

<210> 3
<211> 474
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

<210> 4
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 482
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

```
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480
Phe Tyr
```

<210> 6
<211> 1530
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1530)
<223> PH-20 GPI Заякоренный гликопротеин гиалуронидазы

<400> 6

```
atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa   48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt   96
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct   144
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt   192
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga   240
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80

ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt   288
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95

ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga   336
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110

gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag   384
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125

aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt   432
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct   480
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
```

```
aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat   528
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175

gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt   576
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190

gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa   624
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205

tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt   672
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220

tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat   720
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240

gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc   768
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255

act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta   816
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt   864
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc   912
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300

cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa   960
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320

ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att  1008
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335

gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg  1056
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350

ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac  1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365

gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa  1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380

gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc  1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
```

```
aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca   1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415

gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa   1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430

ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat   1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445

gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt   1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct caa att   1440
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                 470                 475                 480

ttc tac aat gct tca ccc tcc aca cta tct gcc aca atg ttc att gtt   1488
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
                485                 490                 495

agt att ttg ttt ctt atc att tct tct gta gcg agt ttg taa           1530
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu  *
            500                 505
```

<210> 7
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARBOHYD
<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 7

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

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

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного N483 и завершающегося на Y482 сайта BamHI 5' конце

<400> 8
aattggatcc tcagtagaaa atttgaggtt cttc 34

<210> 9

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного Y482 и завершающегося на F481 сайта BamHI 5' конце

<400> 9
aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного F481 и завершающегося на I480 сайта BamHI 5' конце

<400> 10
aattggatcc tcaaatttga ggttcttctg tctc 34

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного I480 и завершающегося на Q479 сайта BamHI 5' конце

<400> 11
aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного Q479 и завершающегося на P478 сайта BamHI 5' конце

<400> 12
aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для синтеза GPI якоря лишенного P478 и завершающегося на E477 сайта BamHI 5' конце

<400> 13
aattggatcc tcattcttct gtctccatgg g 31

<210> 14

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Прямой праймер с рестрикционным сайтом NheI на 5' конце

<400> 14
aattgctagc atgggagtgc taaaattcaa gc 32

<210> 15
<211> 1473
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1473)
<223> sHASEGPup с P478 и меченый His

<400> 15

```
atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa   48
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt   96
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
             20                  25                  30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct   144
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
         35                  40                  45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt   192
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
     50                  55                  60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga   240
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65                  70                  75                  80

ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt   288
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                 85                  90                  95

ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga   336
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110

gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag   384
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125

aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt   432
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140

att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct   480
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
```

```
aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat   528
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175

gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt   576
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190

gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa   624
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205

tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt   672
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220

tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat   720
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240

gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc   768
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
                245                 250                 255

act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta   816
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
            260                 265                 270

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt   864
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
        275                 280                 285

tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc   912
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
    290                 295                 300

cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa   960
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305                 310                 315                 320

ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att  1008
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
                325                 330                 335

gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg  1056
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
            340                 345                 350

ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac  1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
        355                 360                 365

gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa  1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
    370                 375                 380

gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc  1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385                 390                 395                 400
```

```
aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca   1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
                405                 410                 415

gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa   1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
            420                 425                 430

ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat   1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
        435                 440                 445

gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt   1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
    450                 455                 460

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct gga tcc   1440
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gly Ser
465                 470                 475                 480

ggt tct ggt gct cac cat cac cat cac cat taa                      1473
Gly Ser Gly Ala His His His His His His  *
                485                 490
```

<210> 16
<211> 490
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Спейсер His для праймера

<400> 17
ataattggat ccggttctgg tgctcaccat caccatcac 39

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Спейсер HisRev для праймера

<400> 18
tataattgcg gccgcctaat ggtgatggtg atggtgag 38

<210> 19
<211> 30

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на N 483

<400> 19
aatggatcca ttgtagaaaa tttgaggttc 30

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на Y 482

<400> 20
aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc 30

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на F 481

<400> 21
aattggatcc gaaaatttga ggttcttctg 30

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на I 480

<400> 22
attggatcca atttgaggtt cttctgtctc 30

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на Q 479

<400> 23
aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc 29

<210> 24
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на P 478

<400> 24
aattggatcc aggttcttct gtctccatg 29

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Реверсивный (обратный) праймер, не содержащей стоп кодона для синтеза усеченного продукта HIS-sHASEGP лишенного GPI якоря заканчивающийся на E 477

<400> 25
aattggatcc ttcttctgtc tccatggg 28

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на A 467

<400> 26
aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

<210> 27
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на A 447

<400> 27
aattggatcc ctaagctttc tccttacaac tcaag 35

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на S 430

<400> 28
aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt cttc 34

<210> 29
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на G 413

<400> 29
aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag 36

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на S 394

<400> 30
aattggatcc ctatgaattc cagtttttcc ttatac 36

<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на A 372

<400> 31
aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg 35

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный (обратный) праймер для амплификации мутанта с делецией sHASEGP заканчивающийся на S 347

<400> 32
aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg 33

<210> 33
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LN прямой праймер для сайтнаправленного мутагенеза синтеза sHASEGP слитого с каппа лидером с L 36 в качестве первой аминокислоты sHASEGP после каппа лидера

<400> 33
ctgaatttca gagcacctcc tgttattcc 29

<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FR прямой праймер для сайтнаправленного мутагенеза синтеза sHASEGP слитого с каппа лидером с F 38 в качестве первой аминокислоты sHASEGP после каппа лидера

<400> 34
ttcagagcac ctcctgttat tccaaatg 28

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Asp реверсивный (обратный) праймер сайтнаправленного мутагенеза синтеза sHASEGP слитого с каппа лидером с Asp в качестве последней аминокислоты до L 36 или F 38 в PH-20

<400> 35
gtcaccagtg gaacctggaa ccc 23

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Gly реверсивный (обратный) праймер сайтнаправленного мутагенеза синтеза sHASEGP слитого с каппа лидером с Gly в качестве последней аминокислоты до L 36 или F 38 в PH-20

<400> 36
accagtggaa cctggaaccc agag 24

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Прямой праймер для первого фрагмента каппа лидера

<400> 37
gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

<210> 38
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный праймер для первого фрагмента каппа лидера

<400> 38
cccagagcag cagtacccat agcaggagtg 30

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Прямой праймер для второго фрагмента каппа лидера

<400> 39
ggtactgctg ctctgggttc caggttccac 30

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный праймер для второго фрагмента каппа лидера

<400> 40
gcgtcaccag tggaacctgg aacccag 27

<210> 41
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nhe прямой праймер для каппа лидера

<400> 41
attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

<210> 42
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EcoR1 реверсивный праймер для каппа лидера

<400> 42
aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210> 43
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Лидерная последовательность цепи IgK мыши

<400> 43
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1   5   10   15
Gly Ser Thr Gly Asp
            20

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Прямой праймер SPE 1 для К-лидера

<400> 44
actcactagt gctagcatgg agacagacac   30

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Реверсивный праймер MLU1 для К-лидера

<400> 45
aattacgcgt gaattcgtca ccagtggaac   30

<210> 46
<211> 462
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Слитой белок каппа лидера с sHASEGP, содержащего F 38 в качестве первой аминокислоты предполагаемого зрелого секретируемого sHASEGP (вверх до P478)

<400> 46
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1   5   10   15
Gly Ser Thr Gly Asp Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
            20   25   30
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
        35   40   45
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
    50   55   60
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
65   70   75   80
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
                85   90   95
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
            100   105   110
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
        115   120   125
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
    130   135   140
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
145   150   155   160

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

<210> 47
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' Праймер BAM REV для sHASEGP с GPI якорем вверх до L 509, включая стоп

<400> 47
aattggatcc ctacagaaga aatgataaga aacaaaatac 40

<210> 48
<211> 1449
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120

```
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactaa                                                        1449

<210> 49
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1               5                  10                  15
Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
            20                  25                  30
Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
        35                  40                  45
Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
    50                  55                  60
Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65                  70                  75                  80
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
                85                  90                  95
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
            100                 105                 110
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
    130                 135                 140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145                 150                 155                 160
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
            180                 185                 190
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
    210                 215                 220
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225                 230                 235                 240
```

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

<210> 50
<211> 1536
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 50
atgggagtgc taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaatc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaag tgaattttgt 180
cttggaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tcccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agacccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aacccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaatttttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320

```
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctacaatg cttcaccctc cacactatct gccacaatgt tcatttggag gctggaagtc 1500
tgggatcaag gtattagcag aattggtttc ttctga                           1536


<210> 51
<211> 6630
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HZ24 плазмидный вектор

<400>  51
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta     60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc    120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg    180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc    240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat    300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc    360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga    420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg    480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac    540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt    600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc    660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc    720
tcgtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat    780
tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc    840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa    900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac    960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta   1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcatg ggagtgctaa aattcaagca   1080
catctttttc agaagctttg ttaaatcaag tggagtatcc cagatagttt tcaccttcct   1140
tctgattcca tgttgcttga ctctgaattt cagagcacct cctgttattc caaatgtgcc   1200
tttcctctgg gcctggaatg ccccaagtga attttgtctt ggaaaatttg atgagccact   1260
agatatgagc ctcttctctt tcataggaag cccccgaata aacgccaccg ggcaaggtgt   1320
tacaatattt tatgttgata gacttggcta ctatccttac atagattcaa tcacaggagt   1380
aactgtgaat ggaggaatcc cccagaagat ttccttacaa gaccatctgg acaaagctaa   1440
gaaagacatt acattttata tgccagtaga caatttggga atggctgtta ttgactggga   1500
agaatggaga cccacttggg caagaaactg gaaacctaaa gatgtttaca agaataggtc   1560
tattgaattg gttcagcaac aaaatgtaca acttagtctc acagaggcca ctgagaaagc   1620
aaaacaagaa tttgaaaagg cagggaagga tttcctggta gagactataa aattgggaaa   1680
attacttcgg ccaaatcact tgtggggtta ttatcttttt ccggattgtt acaaccatca   1740
ctataagaaa cccggttaca atggaagttg cttcaatgta gaaataaaaa gaaatgatga   1800
tctcagctgg ttgtggaatg aaagcactgc tctttaccca tccatttatt tgaacactca   1860
gcagtctcct gtagctgcta cactctatgt gcgcaatcga gttcgggaag ccatcagagt   1920
ttccaaaata cctgatgcaa aaagtccact tccggttttt gcatataccc gcatagtttt   1980
tactgatcaa gttttgaaat tcctttctca agatgaactt gtgtatacat ttggcgaaac   2040
tgttgctctg ggtgcttctg gaattgtaat atggggaacc ctcagtataa tgcgaagtat   2100
gaaatcttgc ttgctcctag acaattacat ggagactata ctgaatcctt acataatcaa   2160
cgtcacacta gcagccaaaa tgtgtagcca agtgctttgc caggagcaag gagtgtgtat   2220
aaggaaaaac tggaattcaa gtgactatct tcacctcaac ccagataatt ttgctattca   2280
acttgagaaa ggtggaaagt tcacagtacg tggaaaaccg acacttgaag acctggagca   2340
attttctgaa aaattttatt gcagctgtta tagcaccttg agttgtaagg agaaagctga   2400
tgtaaaagac actgatgctg ttgatgtgtg tattgctgat ggtgtctgta tagatgcttt   2460
tctaaaacct cccatggaga cagaagaacc tcaaattttc tactgaggat ccatagctaa   2520
cgcccctctc cctcccccgc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg   2580
tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc   2640
cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa   2700
```

ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 2760
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc 2820
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 2880
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 2940
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 3000
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3060
ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataagctt gccacaaccc acagcggccg 3120
ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcgccgt gtcccaaaat atggggattg 3180
gcaagaacgg agacctaccc tggcctccgc tcaggaacga gttcaagtac ttccaaagaa 3240
tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaatctggt gattatgggt aggaaaacct 3300
ggttctccat tcctgagaag aatcgacctt taaaggacag aattaatata gttctcagta 3360
gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc caaaagtttg gatgatgcct 3420
taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga catggtttgg atagtcggag 3480
gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca cctcagactc tttgtgacaa 3540
ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttcccaga aattgatttg gggaaatata 3600
aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggtcca ggaggaaaaa ggcatcaagt 3660
ataagtttga agtctacgag aagaaagact aaacgcgtgg tacctctaga gtcgacccgg 3720
gcggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 3780
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 3840
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 3900
tcaggggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 3960
cgataaggat ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 4020
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 4080
gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc 4140
gctttcttcc cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg 4200
gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 4260
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 4320
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 4380
atctcggtct attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 4440
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt 4500
tcctgatgcg gtatttttct cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 4560
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4620
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4680
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgagac 4740
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4800
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 4860
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4920
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 5160
gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 5220
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5280
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 5340
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 5400
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5460
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 5520
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5580
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5640
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5700
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5760
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5820
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5880
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5940
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 6000
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 6060
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 6120
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6180
ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6240
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6300

gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6360
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6420
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6480
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6540
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 6600
ggccttttgc tcacatggct cgacagatct 6630

<210> 52
<211> 2009
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52
atgtggctca cataaattca gaaagtatga tagcagtgta ggtggttagc agcacctcat 60
aaggtccttc ctagcaaggc aaagggatgc taatgactag ccaatgctct aggaagacat 120
tgagaccagc caacttcttg ccttgataac tactgaagag acattgggtg gctggatttt 180
gaaagcagac ttctggttat aggtgatgca acttgaaaaa caatcctgaa acatgaaaca 240
agaataataa tatttaaatg taacttaatc attatacctc tttatccatc aaagtgaatt 300
cattccattc cctttcatct gtgctcatac tttgcatcag atattgggta aaccaaagtg 360
tgtaggaaga aataaatgtt ttcatagtca ttactcttta caatgggagt gctaaaattc 420
aagcacatct ttttcagaag ctttgttaaa tcaagtggag tatcccagat agttttcacc 480
ttccttctga ttccatgttg cttgactctg aatttcagag cacctcctgt tattccaaat 540
gtgcctttcc tctgggcctg gaatgcccca agtgaatttt gtcttggaaa atttgatgag 600
ccactagata tgagcctctt ctctttcata ggaagccccc gaataaacgc caccgggcaa 660
ggtgttacaa tattttatgt tgatagactt ggctactatc cttacataga ttcaatcaca 720
ggagtaactg tgaatggagg aatcccccag aagatttcct tacaagacca tctggacaaa 780
gctaagaaag acattacatt ttatatgcca gtagacaatt tgggaatggc tgttattgac 840
tgggaagaat ggagacccac ttgggcaaga aactggaaac ctaaagatgt ttacaagaat 900
aggtctattg aattggttca gcaacaaaat gtacaactta gtctcacaga ggccactgag 960
aaagcaaaac aagaatttga aaaggcaggg aaggatttcc tggtagagac tataaaattg 1020
ggaaaattac ttcggccaaa tcacttgtgg ggttattatc tttttccgga ttgttacaac 1080
catcactata agaaacccgg ttacaatgga agttgcttca atgtagaaat aaaaagaaat 1140
gatgatctca gctggttgtg gaatgaaagc actgctcttt acccatccat ttatttgaac 1200
actcagcagt ctcctgtagc tgctacactc tatgtgcgca atcgagttcg ggaagccatc 1260
agagtttcca aaatacctga tgcaaaaagt ccacttccgg tttttgcata tacccgcata 1320
gtttttactg atcaagtttt gaaattcctt tctcaagatg aacttgtgta tacatttggc 1380
gaaactgttg ctctgggtgc ttctggaatt gtaatatggg gaaccctcag tataatgcga 1440
agtatgaaat cttgcttgct cctagacaat tacatggaga ctatactgaa tccttacata 1500
atcaacgtca cactagcagc caaaatgtgt agccaagtgc tttgccagga gcaaggagtg 1560
tgtataagga aaaactggaa ttcaagtgac tatcttcacc tcaacccaga taattttgct 1620
attcaacttg agaaaggtgg aaagttcaca gtacgtggaa aaccgacact tgaagacctg 1680
gagcaatttt ctgaaaaatt ttattgcagc tgttatagca ccttgagttg taaggagaaa 1740
gctgatgtaa aagacactga tgctgttgat gtgtgtattg ctgatggtgt ctgtatagat 1800
gcttttctaa aacctcccat ggagacagaa gaacctcaaa ttttctacaa tgcttcaccc 1860
tccacactat ctgccacaat gttcattgtt agtattttgt ttcttatcat ttcttctgta 1920
gcgagtttgt aattgcgcag gttagctgaa atgaacaata tgtccatctt aaagtgtgct 1980
ttttcgacta attaaatctt tgaaaagaa 2009

<210> 53
<211> 2395
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 53
atgtggctca cataaattca gaaagtatga tagcagtgta ggtggttagc agcacctcat 60
aaggtccttc ctagcaaggg atgctaatga ctagccaatg ctctaggaag acattgagac 120
cagccaactt cttgccttga taactactga agagacattg ggtggctgga ttttgaaagc 180
agacttctgg ttataggtga tgcaacttga aaaacaatcc tgaaacatga aacaagaata 240

```
ataatattta aatgtaactt aatcattata cctctttatc catcaaagtg aattcattcc   300
attccctttc atctgtgctc atactttgca tcagatattg ggtaaaccaa agtgtgtagg   360
aagaaataaa tgttttcata gtcattactc tttacaatgg gagtgctaaa attcaagcac   420
atctttttca gaagctttgt taaatcaagt ggagtatccc agatagtttt caccttcctt   480
ctgattccat gttgcttgac tctgaatttc agagcacctc ctgttattcc aaatgtgcct   540
ttcctctggg cctggaatgc cccaagtgaa ttttgtcttg gaaaatttga tgagccacta   600
gatatgagcc tcttctcttt cataggaagc ccccgaataa acgccaccgg gcaaggtgtt   660
acaatatttt atgttgatag acttggctac tatccttaca tagattcaat cacaggagta   720
actgtgaatg gaggaatccc ccagaagatt tccttacaag accatctgga caaagctaag   780
aaagacatta cattttatat gccagtagac aatttgggaa tggctgttat tgactgggaa   840
gaatggagac ccacttgggc aagaaactgg aaacctaaag atgtttacaa gaataggtct   900
attgaattgg ttcagcaaca aaatgtacaa cttagtctca cagaggccac tgagaaagca   960
aaacaagaat ttgaaaaggc agggaaggat ttcctggtag agactataaa attgggaaaa  1020
ttacttcggc caaatcactt gtggggttat tatctttttc cggattgtta caaccatcac  1080
tataagaaac ccggttacaa tggaagttgc ttcaatgtag aaataaaaag aaatgatgat  1140
ctcagctggt tgtggaatga aagcactgct ctttacccat ccatttattt gaacactcag  1200
cagtctcctg tagctgctac actctatgtg cgcaatcgag ttcgggaagc catcagagtt  1260
tccaaaatac ctgatgcaaa aagtccactt ccggtttttg catatacccg catagttttt  1320
actgatcaag ttttgaaatt cctttctcaa gatgaacttg tgtatacatt tggcgaaact  1380
gttgctctgg gtgcttctgg aattgtaata tggggaaccc tcagtataat gcgaagtatg  1440
aaatcttgct tgctcctaga caattacatg gagactatac tgaatcctta cataatcaac  1500
gtcacactag cagccaaaat gtgtagccaa gtgctttgcc aggagcaagg agtgtgtata  1560
aggaaaaact ggaattcaag tgactatctt cacctcaacc cagataattt tgctattcaa  1620
cttgagaaag gtggaaagtt cacagtacgt ggaaaaccga cacttgaaga cctggagcaa  1680
ttttctgaaa aattttattg cagctgttat agcaccttga gttgtaagga gaaagctgat  1740
gtaaaagaca ctgatgctgt tgatgtgtgt attgctgatg gtgtctgtat agatgctttt  1800
ctaaaacctc ccatggagac agaagaacct caaatttttct acaatgcttc accctccaca  1860
ctatctgcca caatgttcat ttggaggctg gaagtctggg atcaaggtat tagcagaatt  1920
ggtttcttct gagagtcatg agggaaaaat gtgtttcagg cctcttccct tggcttacag  1980
gaaatgaaaa aaccatgact atcatcacca acatccttgg gtattaagtg cagtcactct  2040
cctagatgct gtggggagaa ggcaagttac aaagatagac cttccctcaa gataatcaga  2100
ttttcatggt attatcctta acctttttga catcatggag gctttgggaa tctgatgaag  2160
cctatcaatt ttcttccaga agatatttat ataagattat aagaaaaatt atgtacacag  2220
cttattttat tgcattggat caaaatgcca tttataaaga attatgcctt ttccatcaat  2280
tttagcatgg aaaaataatt tcaggcaata tgcttaaaaa ttgggggaag acaaaagaaa  2340
tccatatcgt gtaaataaaa ataaattttg gttttgctca aaaaaaaaaa aaaaa       2395
```