(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월15일
(11) 등록번호 10-1233457
(24) 등록일자 2013년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 1/00* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
*A61K 38/17* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7020286(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년03월05일
심사청구일자 2011년08월31일
(85) 번역문제출일자 2011년08월31일
(65) 공개번호 10-2011-0114692
(43) 공개일자 2011년10월19일
(62) 원출원 특허 10-2005-7016302
원출원일자(국제) 2004년03월05일
심사청구일자 2009년03월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/006656
(87) 국제공개번호 WO 2004/078140
국제공개일자 2004년09월16일
(30) 우선권주장
60/452,360 2003년03월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Matrix Biol. December 2001, vol. 20. No. 8, pages 515-525.
US5721348 A
전체 청구항 수 : 총 44 항

(73) 특허권자
**할로자임, 아이엔씨**
미국 캘리포니아 92121 샌디에고, 소렌토 밸리 로드 11388
(72) 발명자
**북바인더 루이스, 에이치.**
미국 캘리포니아 92128 샌디에고, 게이블 릿지 로드 14823
**쿤두 애너밴**
미국 캘리포니아 92116 샌디에고, 에이피티.24, 먼로에 애비뉴 3535
**프로스트 그레고리, 아이.**
미국 캘리포니아 92014 델마, 머카도 드라이브 13662
(74) 대리인
**안소영**

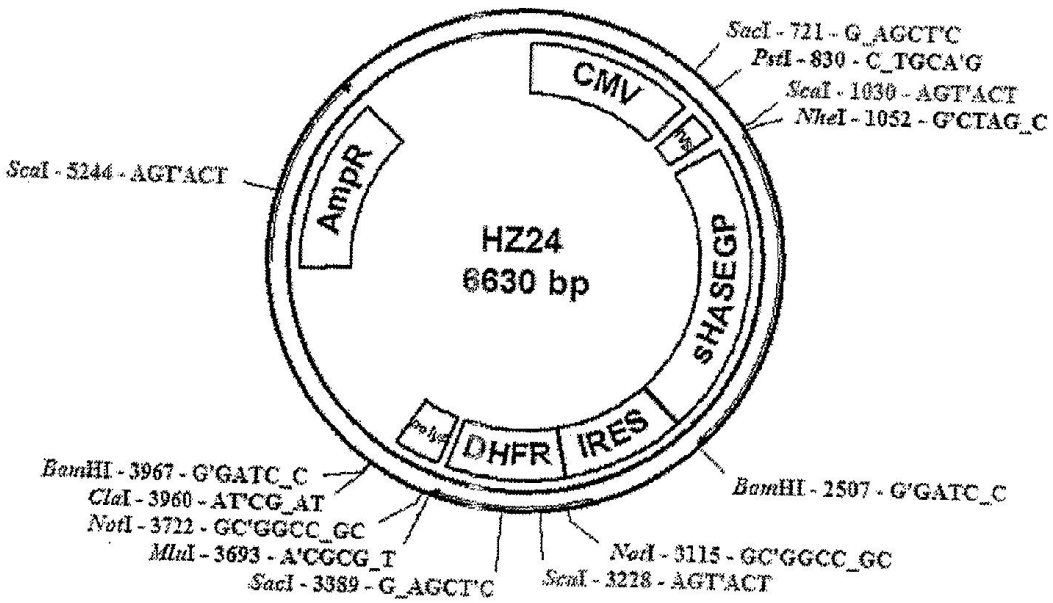
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **가용성 하이알우로니다제 당단백질 (sHASEGP), 이를 제조하는 방법, 용도 및 이를 포함하는 약학 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 신규의 가용성 중성 활성 하이알우로니다제 당단백질(sHASEGP)의 발견, 제조 방법, 및 다른 분자의 투여를 촉진하거나 글리코스아미노글리칸 관련 병리를 완화시키기 위한 그들의 용도에 관련된다. 가용성 중성 활성 sHASEGP 도메인의 최소 활성 폴리펩티드 도메인은 기능적 중성 활성 하이알우로니다제 도메인에 필요한 아스파라긴-결합된 당 모이어티를 포함하는 것으로 개시된다. sHASEGP의 분비를 증가시키는 변형된 아미노 말단 리더 펩티드가 포함된다. 본 발명은 추가로 천연 도살장 효소에 비하여 안정성 및 혈청 약동학을 개선하기 위한 재조합 sHASEGP의 시알화 및 PEG화 형태를 포함한다. 최적 활성에 필요한 적절한 당화를 생성하는 진핵 세포로부터 유래된 실질적으로 정제된 재조합 sHASEGP 당단백질의 적합한 형성이 추가로 개시된다.

대 표 도


HZ24
6630 bp
CMV
sHASEGP
IRES
DHFR
AmpR
SacI - 721 - G_AGCT'C
PstI - 830 - C_TGCA'G
ScaI - 1030 - AGT'ACT
NheI - 1052 - G'CTAG_C
ScaI - 5244 - AGT'ACT
BamHI - 2507 - G'GATC_C
NotI - 3115 - GC'GGCC_GC
ScaI - 3228 - AGT'ACT
SacI - 3389 - G_AGCT'C
MluI - 3693 - A'CGCG_T
NotI - 3722 - GC'GGCC_GC
ClaI - 3960 - AT'CG_AT
BamHI - 3967 - G'GATC_C

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

하이알우로니다제 폴리펩티드의 아스파라긴(N) 잔기에 공유 결합되어 있는 하나 이상의 당 모이어티를 포함하는 가용성 하이알우로니다제 폴리펩티드로서,

하이알우로니다제 폴리펩티드는 촉매적으로 활성이고;

하이알우로니다제 폴리펩티드는

a) 서열 번호 1의 아미노산 36-464 를 포함하고, 서열 번호 1의 C 말단의 서열 번호 1의 아미노산 잔기 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 또는 483 에서 말단절단된, 서열 번호 1 내 아미노산 서열;

b) 아미노산 잔기 36-483 으로 이루어진 폴리펩티드와 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는

c) 상기 a) 의 아미노산 서열 내에 아미노산 치환들을 포함하는 아미노산 서열로서, 아미노산 치환된 하이알우로니다제 당단백질은 상기 a)의 서열과 약 98% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 아미노산 서열

로 이루어진 것인,

가용성 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 폴리펩티드가

서열 번호 1의 아미노산 36-482 또는 서열 번호 1의 아미노산 1-482를 암호화하는 핵산 분자; 또는

서열 번호 6의 뉴클레오티드 106-1446 의 서열을 포함하는 핵산 분자

에 의하여 암호화되는 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항에 있어서, 서열 번호 1의 아미노산 36-477, 36-478, 36-479, 36-480, 36-481, 36-482 또는 36-483 으로써 개시된 아미노산 서열을 가지거나, 서열 번호 1의 아미노산 36-477, 36-478, 36-479, 36-480, 36-481, 36-482 또는 36-483 으로써 개시된 아미노산 서열과 약 98 % 이상의 서열 동일성을 가지는 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 폴리펩티드가 CHO 세포에서 생산되어 분비된 것인 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 8**

하이알우로니다제 폴리펩티드의 아스파라긴(N) 잔기에 공유 결합되어 있는 하나 이상의 당 모이어티를 포함하는 하이알우로니다제 폴리펩티드로서,

하이알우로니다제 폴리펩티드는 촉매적으로 활성이고;

하이알우로니다제 폴리펩티드는 서열 번호 3의 아미노산 1-450 또는 아미노산 1-459 로 제시된 아미노산 서열로 이루어진 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 9**

제1항, 제3항, 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 중합체로 변형된 것인 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 중합체가 PEG 또는 덱스트란인 하이알우로니다제 폴리펩티드.

**청구항 11**

제1항의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자로서,

제1항의 폴리펩티드를 암호화하기 위한 중지 코돈을 포함하거나, 제1항의 폴리펩티드를 암호하기 위하여 465-508 중 어느 곳 이후의 아미노산들을 암호화하는 영역을 결여하고;

핵산의 발현시 제1항의 암호화된 하이알우로니다제 폴리펩티드가 생산되는 핵산 분자.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 서열 번호 48에 개시된 뉴클레오티드 서열 또는 서열 번호 6의 뉴클레오티드 106-1446 으로써 개시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 뉴클레오티드 서열은 암호화된 폴리펩티드의 분비를 위한 신호 서열을 암호화하는 것인 핵산 분자.

**청구항 14**

제11항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 서열 번호 51에 개시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 진핵성 벡터인 벡터.

**청구항 18**

제14항에 있어서, 피치아(*Pichia*) 벡터, 이.콜리(*E.coli*) 벡터, 또는 바이러스 벡터인 벡터.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 아데노바이러스벡터인 벡터.

**청구항 20**

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 분리된 세포.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 원핵 세포 또는 진핵 세포인 세포.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포로부터 선택되는 것인 세포.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 포유류 세포인 세포.

**청구항 24**

적합한 프로모터에 작동적으로 연결된 제1항의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을, N-결합된 당 모이어티를 상기 폴리펩티드 내로 통합할 수 있는 세포 내로 도입하는 단계;

암호화된 폴리펩티드가 상기 세포에 의해 발현되는 조건하에서 상기 세포를 배양하는 단계; 및

발현된 폴리펩티드(들)을 회수하는 단계를 포함하는

제1항의 하이알우로니다제 폴리펩티드를 생산하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 세포가 진핵 세포인 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포, 곤충 세포, 효모 세포 또는 식물 세포로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 27**

제24항에 있어서, 세포가 CHO 세포인 방법.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

제1항, 제3항, 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 하이알우로니다제 폴리펩티드를 포함하는, 과량의 글리코스아미노글리칸과 연관된 질병 또는 상태 치료용; 종양 치료용; 심장혈관 질환 치료용; 고형 종양 내로의 화학요법제 침투 증가용; 글리코스아미노글리칸 제거용 또는 유리체액(vitreous humor)의 액화 유도용; 과량의 글리코스아미노글리칸을 함유하는 조직으로 500 nm 미만의 크기 분자 전달용; 괴사 조직의 혈관재형성 촉진용; 눈의 안압 감소용; 아교 흉터에서 콘드로이친 설페이트 프로테오글리칸(CSPG)의 분해용; 원반탈출증 치료용; 생체외 수정용; 전이성 및 비전이성 암 치료용; 수액 피하 주사 증강용; 치료 분자의 주사 촉진용; 포유류 눈의 안 질환 치료용; 말초 조직 괴사 치료용; 마취 증강용; 또는 신경절 낭 치료용 약학 조성물.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 약학적 활성 제제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 약학적 활성 제제가 소분자, 단백질, 핵산 및 핵산을 포함하는 비히클 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 핵산이 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 또는 DNA 복합체 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 33**

제30항에 있어서, 약학적 활성 제제는 화학요법제, 진통제, 항염증제, 항균제, 아메바살균제, 트리코모나스 제거제, 항-파킨슨제, 항-말라리아제, 항경련제, 항우울제, 항관절염제, 항진균제, 항고혈압제, 해열제, 항기생충제, 항히스타민제, 알파-아드레날린 아고니스트제, 알파 차단제, 마취제, 기관지 확장제, 살생물제, 살균제, 세균발육저지제, 베타아드레날린 차단제, 칼슘 채널 차단제, 심혈관 약물제, 피임제, 충혈제거제, 이뇨제, 억제제, 진단제, 전해질제, 수면제, 호르몬제, 고혈당제, 근육 이완제, 근육 수축제, 안과 제제, 부교감신경흥분 작용제, 정신 활력제, 진정제, 교감신경흥분 작용제, 신경안정제, 비뇨제, 질 제, 바이러스살멸제, 비타민제, 비스테로이드 항염증제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 약물, 유기 분자 및 수면 유도제 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 34**

제30항에 있어서, 약학적 활성 제제가 코르티코스테로이드, 인슐린, 사이토카인, 항체 및 모노클로날 항체 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 35**

제29항에 있어서, 국부, 국소, 장내, 비경구, 낭포내, 피부내, 유리체내, 피하, 근육내, 또는 정맥내 투여를 위하여 제형화된 약학 조성물.

**청구항 36**

제29항의 약학 조성물; 및

(a) 사용 안내서 및 (b) 약학 조성물의 사용을 위한 키트 사용에 대한 안내서 중 하나 이상을

포함하는 키트.

**청구항 37**

제29항의 약학 조성물; 및

약학적 활성 제제

를 포함하는 조합물.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 약학적 활성 제제가 소분자, 단백질, 핵산 및 핵산을 포함하는 비히클 중에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 핵산이 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 또는 DNA 복합체 중에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 40**

제37항에 있어서, 약학적 활성 제제가 화학요법제, 진통제, 항염증제, 항균제, 아메바살균제, 트리코모나스 제거제, 항-파킨슨제, 항-말라리아제, 항경련제, 항우울증제, 항관절염제, 항진균제, 항고혈압제, 해열제, 항기생충제, 항히스타민제, 알파-아드레날린 아고니스트제, 알파 차단제, 마취제, 기관지 확장제, 살생물제, 살균제, 세균발육저지제, 베타아드레날린 차단제, 칼슘 채널 차단제, 심장혈관 약물제, 피임제, 충혈제거제, 이뇨제, 억제제, 진단제, 전해질제, 수면제, 호르몬제, 고혈당제, 근육 이완제, 근육 수축제, 안과 제제, 부교감신경흥분 작용제, 정신 활력제, 진정제, 교감신경흥분 작용제, 신경안정제, 비뇨제, 질 제, 바이러스살멸제, 비타민제, 비스테로이드 항염증제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 약물, 유기 분자 및 수면 유도제 중에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 41**

제37항에 있어서, 약학적 활성 제제가 코르티코스테로이드, 인슐린, 사이토카인, 항체 및 모노클로날 항체 중에서 선택되는 것인 조합물.

**청구항 42**

제1항의 하이알우로니다제 폴리펩티드 또는 제1항의 하이알우로니다제 폴리펩티드의 도메인을 포함하는 접합체.

**청구항 43**

제1항, 제3항, 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 하이알우로니다제 폴리펩티드 및 치료제를 포함하는, 치료제의 전달을 위해 포유류의 표적 조직에서 글리코스아미노글리칸을 분해하는 데 사용하기 위한 조성물로서,

상기 치료제는 화학요법제, 진통제, 항염증제, 항균제, 아메바살균제, 트리코모나스 제거제, 항-파킨슨제, 항-말라리아제, 항경련제, 항우울제, 항관절염제, 항진균제, 항고혈압제, 해열제, 항기생충제, 항히스타민제, 알파-아드레날린 아고니스트제, 알파 차단제, 마취제, 기관지 확장제, 살생물제, 살균제, 세균발육저지제, 베타아드레날린 차단제, 칼슘 채널 차단제, 심혈관 약물제, 피임제, 충혈제거제, 이뇨제, 억제제, 진단제, 전해질제, 수면제, 호르몬제, 고혈당제, 근육 이완제, 근육 수축제, 안과 제제, 부교감신경흥분 작용제, 정신 활력제, 진정제, 교감신경흥분 작용제, 신경안정제, 비뇨제, 질 제, 바이러스살멸제, 비타민제, 비스테로이드 항염증제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 약물, 유기 분자, 수면 유도제, 코르티코스테로이드, 인슐린, 사이토카인, 항체 및 모노클로날 항체 중에서 선택되는 것인 조성물.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 정맥내 주사 또는 혈류 내로의 주입 또는 비경구 투여를 위해 제형화된 조성물.

**청구항 45**

제1항, 제3항, 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 하이알우로니다제 폴리펩티드 및 종양 치료용 항암제를 포함하는 조성물.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 항암제는 화학치료제, 항체, 펩티드, 유전자 치료 벡터, 바이러스 및 DNA 중에서 선택되는 조성물.

**청구항 47**

제1항, 제3항, 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 하이알우로니다제 폴리펩티드를 포함하는, 종양으로 생물제제의 전달에 사용하기 위한 조성물.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 생물제제는 모노클로날 항체 또는 사이토카인인 조성물.

# *명 세 서*

## *기 술 분 야*

[0001] 본 출원은 그 전체가 참고로 본원에 인용되며, 2003년 3월 5일에 출원된 미국 출원 제 60/452,360호에 대하여 35 U.S.C.§119(e)하에서 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 중성-활성이며, 가용성인 하이알우로니다제 당단백질(sHASEGP), 그 일부, 특히 하이알우로니다제 도메인에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 질병 치료에서 글리코스아미노글리칸의 치료적 변형을 위해 그리고 동물에서 직경 200 나노미터 미만의 다른 주입된 분자의 확산을 증가시키기 위해 사용하기 위해, 하이알우로니다제 당단백질 및 그 도메인 및 그 암호 핵산 분자를 이용하는, 화학적 변형, 약학 조성물, 발현 플라스미드, 제조 및 치료 방법에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0003] 글리코스아미노글리칸(GAG)은 세포외 매트릭스(ECM)의 복잡한 선형 다당류이다. GAG는 N-치환된 헥소스아민과 우론산의 이당류 구조 [하이알우로난(HA), 콘드로이친 설페이트(CS), 콘드로이친(C), 더마탄 설페이트(DS), 헤파란 설페이트(HS), 헤파린(H)], 또는 N-치환된 헥소스아민과 갈락토스의 이당류 구조[케라탄 설페이트(KS)]를

반복하는 것을 특징으로 한다. HA를 제외하고는, 모두 코어 단백질에 공유 결합되어 존재한다. 그들의 코어 단백질을 가진 GAG는 구조적으로 프로테오글리칸(PG)로 불린다.

[0004] 하이알우로난(HA)은 포유류에서 주로 연결 조직, 피부, 연골, 및 활액에서 발견된다. 하이알우로난은 또한 눈의 유리체의 주요 구성성분이다. 연결 조직에서, 하이알우로난과 연합된 수화물은 조직 사이에 공간을 형성하여, 세포 이동 및 증식에 도움이 되는 환경을 형성한다. 하이알우로난은 신속한 발생, 재생, 회복, 배발생, 발생학적 발생, 상처 치유, 혈관신생, 및 종양발생을 비롯한 세포 운동성과 관련된 생물학적 현상에서 주요 역할을 한다 (Toole 1991 Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand et al. 1992 Int. J. Cancer 52: 1-6; Knudson et al, 1993 FASEBJ. 7: 1233-1241). 또한, 하이알우로난 농도는 종양의 공격성과 상관된다 (Ozello et al. 1960 Cancer Res. 20: 600-604; Takeuchi et al. 1976, Cancer Res. 36: 2133-2139; Kimata et al. 1983 Cancer Res. 43: 1347-1354).

[0005] HA는 많은 세포, 특히 연성 연결 조직의 세포외 매트릭스에서 발견된다. HA는 물 및 혈장 단백질 항상성에서와 같은 다양한 생리학적 기능을 한다 (Laurent TC et al (1992) FASEB J 6: 2397-2404). HA 생산은 증식 세포에서 증가하며 유사분열에서 역할을 할 수도 있다. 또한 운동 및 세포 이동에도 관련된다. HA는 세포 조절, 발생, 및 분화에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다 (상기의 Laurent 등).

[0006] HA는 임상 의약에서 사용되어 왔다. 그것의 조직 보호적 및 유동적 특성은 안과 수술에서 백내장 수술동안 각막 내피를 보호하기 위해 유용한 것으로 입증되었다. 혈청 HA는 간 질병, 및 류마티스 관절염과 같은 다양한 염증성 상태를 진단한다. HA의 축적에 의해 야기된 사이질 부종은 다양한 기관에서 기능장애를 야기할 수도 있다 (상기의 Laurent 등).

[0007] 하이알우로난 단백질 상호작용은 또한 세포외 매트릭스 또는 "기저 물질"의 구조에 관련된다.

[0008] 하이알우로니다제는 동물에서 발견되는 중성- 및 산성-활성 효소의 군이다. 하이알우로니다제는 기질 특이성 및 작용 기작에 관하여 다양하다.

[0009] 세 가지 일반적인 부류의 하이알우로니다제가 있다:

[0010] 1. 주요 최종 생성물로서 사당류와 육당류를 갖는 엔도-베타-N-아세틸헥소스아미니다제인 포유류-타입 하이알우로니다제 (EC 3.2.1.35). 이들은 가수분해 활성 및 트랜스글리코시다제 활성 둘다를 가지며, 하이알우로난 및 콘드로이친 설페이트(CS), 특히 C4-S 및 C6-S를 분해할 수 있다.

[0011] 2. 박테리아 하이알우로니다제 (EC 4.2.99.1)는 하이알우로난 및, 다양한 정도로 CS 및 DS를 분해한다. 이들은 주로 이당류 최종 생성물을 생성하는 베타 제거 반응에 의해 작용하는 엔도-베타-N-아세틸헥소스아미니다제이다.

[0012] 3. 거머리, 다른 기생충, 및 갑각류로부터의 하이알우로니다제 (EC 3.2.1.36)는 베타 1-3 결합의 가수분해를 통하여 사당류와 육당류를 생성하는 엔도-베타-글루쿠로니다제이다.

[0013] 포유류 하이알우로니다제는 추가로 두 그룹으로 나누어질 수 있다: 중성 활성 효소 및 산성 활성 효소. 사람 게놈에는 HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 및 PH20/SPAM1인 6개의 하이알우로니다제-형 유전자가 있다. HYALP1은 슈도유전자이며, HYAL3은 어느 공지의 기질에 대해서도 효소 활성을 보유하지 않는 것으로 나타났다. HYAL4는 콘드로이티나제이며 하이알우로난에 대한 활성이 없다. HYAL1은 기본형 산성-활성 효소이며 PH20은 기본형 중성-활성 효소이다. HYAL1 및 HYAL2와 같은 산성 활성 하이알우로니다제는 중성 PH에서 촉매 활성이 없다. 예를 들어, HYAL1은 pH 4.5이상에서 생체외에서 촉매 활성이 없다 (Frost et al Anal Biochemistry, 1997). HYAL2는 생체외에서 매우 낮은 비활성을 갖는 산성 활성 효소이다.

[0014] 하이알우로니다제-형 효소는 또한 사람 HYAL2와 사람 PH20과 같이 글리코실포스파티딜 이노시톨 앵커를 통하여 혈장막에 고정되는 것들 (Danilkovitch-Miagkova, et al.Proc Natl Acad Sci U SA. 2003 Apr 15;100 (8): 4580-5, Phelps et al., Science 1988) 및 사람 HYAL1과 같이 가용성인 것들 (Frost et al,Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 9; 236(1): 10-5)을 특징으로 할 수 있다. 하지만, 종에 따라 다르다: 소의 경우, 예를 들어 PH20은 혈장 막에 매우 느슨하게 부착되며, 포스포리파제 민감성 앵커를 통하여 고정되지 않는다 (Lalancette et al,Biol Reprod. 2001 Aug; 65 (2): 628-36). 소 하이알우로니다제의 이 독특한 특징은 임상 사용을 위한 추출물로서 가용성 소 고환 하이알우로니다제 효소의 사용을 허용하였다 (Wydase®

, Hyalase®

). 다른 PH20 종은 계면활성제 또는 리파제를 사용하지 않고 가용성인 지질 고정된 효소이다. 예를 들어, 사람 PH20은 GPI 앵커를 통하여 혈장 막에 고정된다. 폴리펩티드내로 지질 앵커를 도입하지 않는 사람 PH20 DNA 구조체를 만들기 위해 시도한 결과 촉매적으로 비활성인 효소, 또는 불용성 효소가 얻어졌다 (Arming et al Eur JBiochem. 1997 Aug 1; 247 (3): 810-4). 자연 발생의 머카크 정자 하이알우로니다제는 가용성 형태 및 막 결합 형태 둘다로 발견된다. 64 kDa의 막 결합 형태는 pH 7.0에서 효소 활성을 보유하는 한편, 54 kDa 형태는 단지 pH 4.0에서만 활성이다 (Cherr et al, Dev Biol. 1996 Apr 10; 175(1): 142-53.). 따라서, PH20의 가용성 형태는 종종 중성 조건하에서는 효소 활성이 없다.

[0015] 콘드로이티나제는 동물 전체에서 발견되는 효소이다. 이들 효소는 엔도글리코시다제 반응을 통하여 글리코스아미노글리칸을 분해한다. 공지의 콘드로이티나제의 구체적인 예는 콘드로이티나제 ABC (프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*)에서 유래; 일본 특허 출원 공개 제6-153947호, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523(1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai, and T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243, 1543(1968)), 콘드로이티나제 AC (플라보박테리움 헤파리눔(*Flavobacterium heparinum*)에서 유래; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523(1968)), 콘드로이티나제 AC II (아르트로박터 아우레센스(*Arthrobacter aurescens*)에서 유래; K.Hiyama, and S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824(1975), K.Hiyama and S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201(1976)), 하이알우로니다제 ACIII (플라보박테리움 종 Hp102에서 유래; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023(1989)), 콘드로이티나제 B(플라보박테리움 헤파리움에서 유래; Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973(1974), Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121(1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akiko Ueno, and Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189(1985)), 콘드로이티나제 C (플라보박테리움 종 Hp102에서 유래; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Kelichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023(1939)) 등을 포함한다.

[0016] 당단백질은 하나 이상의 탄수화물 부분에 공유 결합된 폴리펩티드 쇄로 구성된다. 그들의 구성 단백질에 N-글리코시드 또는 O-글리코시드 결합을 통해 결합된 탄수화물을 보유하는 당단백질은 두 가지 카테고리가 있다. N- 및 O-결합된 글리칸은 각각 아스파라긴-N-아세틸-D-글루코스아민 및 세린(트레오닌)-N-아세틸-D-갈락토스아민 결합을 통하여 폴리펩티드에 부착된다. 복잡한 N-결합된 올리고당은 말단 만노즈 잔기를 함유하지 않는다. 이들은 단지 말단 N-아세틸글루코스아민, 갈락토스, 및/또는 시알산 잔기를 함유한다. 하이브리드 올리고당은 말단 N-아세틸글루코스아민, 갈락토스, 및/또는 시알산 잔기뿐만 아니라 말단 만노즈 잔기를 함유한다.

[0017] N-결합된 당단백질의 경우, 올리고당 전구체는 소포체에서 펩티드 합성동안 아스파라긴의 아미노기에 부착된다. 올리고당 모이어티는 이어서 당 모이어티를 제거하고 추가하는 특정 효소 시리즈에 의해 순차적으로 가공된다. 프로세싱은 소포체에서 일어나며 시스-, 중간- 및 트랜스-골지체를 통과하면서 계속된다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0018] 가용성의 중성 활성인 하이알우로니다제 당단백질 패밀리, 특히 사람 가용성 PH-20 하이알우로니다제 당단백질(여기서 sHASEGP로도 불림)이 여기서 제공된다. 여기서 제공되는 sHASEGP는 sHASEGP 패밀리 멤버이며, 여기서 sHASEGP로 표시된다. 가용성 하이알우로니다제 도메인 및 그 용도 또한 여기서 제공된다.

### *과제의 해결 수단*

[0019] 본 발명은 사람 PH20 cDNA의 카르복시 말단에서 아미노산을 암호하는 좁은 영역이 결핍된 핵산을 도입함으로써, 포유류 발현 시스템에서 높은 수율로 가용성의, 중성-활성인 하이알우로니다제 활성이 생산될 수 있다는 발견에 기초한다. 비천연 리더 펩티드의 사용에 의해 분비를 증가시키기 위한 sHASEGP의 추가적인 변형 또한 제공된다. 폴리에틸렌 글리콜로 단백질을 마스크하고 천연 당화를 번역후 변형시킴으로써 반감기를 지연시키기 위해 sHASEGP를 변형하는 방법 또한 제공된다. 분비된 중성 활성 사람 sHASEGP를 생성하기 위한 이전의 시도는 실패하였다. 사람 sHASEGP 폴리펩티드의 절단은 중성 효소 활성의 손실을 야기하고, 및 포유류 발현 시스템에서 세포가 재조합 단백질을 분비하지 못하도록 하는 것으로 결론내려졌다 (Arming, et al Eur J Biochem 1997 Aug 1; 247 (3):810-4). 상업적 생산 및 하이알우로니다제로서 치료적 유용성을 위해 중성-활성의 분비된 sHASEGP를 생성하는 것이 중요하다. 여기서 개시된 본 발명은 그러한 문제를 해결한다.

[0020] 본 발명은 추가로 sHASEGP가 하나 이상의 N-결합된 당 모이어티를 보유하는, 촉매적으로 활성인 사람 sHASEGP 당단백질을 추가로 포함한다. 여기서 나타난 연구는 사람 PH20이 촉매 활성을 위해 N-결합된 글리칸을 필요로 하는 한편, 소 및 벌 독 하이알우로니다제는 그러한 N-결합된 글리칸 없이도 활성임을 보여준다. N-결합된 부분이 없는 사람 하이알우로니다제 도메인은 촉매적으로 비활성이다. 따라서 고전적인 재조합 DNA 기법은 이.콜리에서 생산될 수 있는 벌 독 HASEGP와 달리, 촉매적으로 활성인 사람 sHASEGP의 생산을 허용하지 않는다.

[0021] 본 발명은 상기 N-결합된 당 모이어티를 도입할 수 있는 세포를 이용하거나 또는 상기 N-결합된 부분을 sHASEGP 폴리펩티드상에 도입함으로써, N-결합된 sHASEGP 당단백질 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법과 세포를 포함한다. 적절히 당화된 sHASEGP를 확인하는 방법 또한 개시된다.

[0022] 촉매적으로 활성인 과-시알화된 sHASEGP 당단백질 또한 제공된다. 과-시알화된 sHASEGP는 자연 발생하는 비시알화된 소 및 양 고환 sHASEGP과 비교할 때 더 큰 혈청 반감기를 보유하며, 따라서 효소 안정성 및 정맥내 약으로서 사용하기에 바람직하다. 본 발명은 과-시알화된 sHASEGP의 제조 방법, 그 조성물 및 용도를 제공한다.

[0023] 자연적으로 GPI 앵커가 없는 sHASEGP의 스플라이스 변이체에 의해 암호되는 단백질 또한 제공된다.

[0024] 금속 이온을 갖는 가용성 sHASEGP 당단백질을 포함하는 sHASEGP의 조성물이 추가로 제공되며, 이때 금속 이온은 칼슘, 마그네슘 또는 나트륨이다. sHASEGP는 상기 금속의 존재하에서 적절하게 활성이다. 상기 금속 이온의 존재하에서 sHASEGP로 구성되는 제제 또한 제공된다.

[0025] 반감기를 더 연장시키기 위한 sHASEGP의 변형이 제공된다. 폴리에틸렌 글리콜 및 덱스트란과 같은 중합체를 이용한 sHASEGP의 화학적 변형이 제공된다. 그러한 변형은 sHASEGP가 순환계 및 면역 시스템으로부터 제거되지 않도록 하며, 또한 만노즈와 어시알로당단백질을 위한 당화 수용체를 차단한다. 당화 부위, 양성 전하를 띤 아미노산 및 시스테인과 같은 특정 기능성 기에 연결시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0026] 작은 분자를 비롯한 화합물과 같은 효과인자, 및 pH, 온도 및 이온 강도와 같은, sHASEGP의 활성화, 발현 또는 활성을 조절하는 조건을 확인하는 분석 또한 여기서 제공된다. 예시적인 분석에서, sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인이 공지의 기질, 일반적으로 글리코스아미노글리칸 또는 프로테오글리칸을 절단하는 능력에 대한 시험 화합물의 효과를 평가한다. 하이알우로니다제 도메인의 활성을 조절하는 제제, 일반적으로 화합물, 특히 작은 분자는 sHASEGP의 활성을 조절하기 위한 후보 화합물이다. 하이알우로니다제 도메인은 또한 활성을 교란하는 기능을 갖는 하이알우로니다제-특이적 항체를 생산하기 위해 이용될 수 있다. 여기서 제공된 하이알우로니다제 도메인은 생체외에서 촉매 활성을 나타내는 C-말단 절단된 그 일부를 갖는 N-말단 글리코실-히드로라제 도메인을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0027] 단백질 및 하이알우로니다제 도메인을 암호하는 핵산 분자 또한 제공된다. 가용성 하이알우로니다제 도메인 또는 촉매적으로 활성인 그 일부를 암호하는 핵산 분자 및 또한 전체-길이 sHASEGP를 암호하는 핵산 분자가 제공된다. 하이알우로니다제 도메인과 그 하부의 핵산을 암호하는 핵산은 서열 번호 6에 개시되며, sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인은 서열 번호 1(아미노산 35-464)에 개시된다. 전체-길이 sHASEGP의 단백질 서열 및 암호 핵산 서열은 서열 번호 1 및 6에 개시된다.

[0028] 그들의 전체-길이 또는 전체-길이의 적어도 약 70%, 80%, 또는 90%를 따른 그러한 sHASEGP-암호 핵산에 하이브리드하며 하이알우로니다제 도메인 또는 그 일부를 암호하는 핵산 분자가 또한 제공된다. 하이브리드화는 일반적으로 적어도 낮은, 일반적으로 적어도 중간의, 그리고 종종 높은 엄격도 하에서 이루어진다.

[0029] 분리된 핵산 단편은 게놈 또는 cDNA를 비롯한 DNA이거나, 또는 RNA이며, 또는 단백질 핵산 또는 다른 뉴클레오티드 유사체와 같은 다른 성분을 포함할 수 있다. 분리된 핵산은 이종성 또는 천연 프로모터, 및 다른 전사 및 번역 조절 서열과 같은 추가 성분을 포함할 수 있으며, 이들 유전자는 리포터 유전자 또는 다른 지시자 유전자 또는 지시자를 암호하는 유전자에 연결될 수 있다.

[0030] sHASEGP를 암호하는 뉴클레오티드 서열 또는 그 일부에 상보적인 분자의 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자가 제공된다.

[0031] 프로브 또는 프라이머로 이용될 수 있으며 서열 번호 6에 개시된 적어도 약 10, 14, 16 뉴클레오티드, 일반적으로는 1000 미만 또는 100 이하 뉴클레오티드(또는 그 상보체)를 함유하거나, 또는 적어도 약 30 뉴클레오티드(또는 그 상보체)를 함유하거나 또는 임의의 그러한 단편 또는 올리고뉴클레오티드에 그들의 전체-길이(또는 적어도 약 70, 80 또는 90%)를 따라 하이브리드하는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드 또는 상기 분리된 핵산 분자의 단편이 제공된다. 단편의 길이는 그들이 이용되는 목적의 함수 및/또는 대상 게놈의 복

잡성의 함수이다. 일반적으로 프로브 및 프라이머는 약 50,150 또는 500 뉴클레오티드 미만을 함유한다.

[0032] 여기서 제공된 임의의 핵산 분자를 함유하는 플라스미드 또한 제공된다. 상기 플라스미드를 함유하는 세포 또한 제공된다. 그러한 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 진균류 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포를 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0033] sHASEGP를 효율적으로 분비할 수 있는 시그널 리더를 이용하는 개선된 포유류 발현 시스템 또한 제공된다. 그러한 효율적인 분비 리더 펩티드 아미노산 서열 및 sHASEGP와의 융합 단백질의 예는 서열 번호 43 및 46에서 발견된다.

[0034] 전술한 세포를, sHASEGP가 세포에 의해 발현되는 조건하에서 성장시키고, 발현된 sHASEGP 폴리펩티드 또는 당단백질을 회수함으로써 sHASEGP를 생산하는 방법이 또한 제공된다. 다른 sHASEGP를 암호하는 핵산을 분리하기 위한 방법이 또한 제공된다.

[0035] sHASEGP 폴리펩티드가 세포의 표면에 발현되는 포유류 세포 및 효모 세포와 같은 세포, 일반적으로 진핵 세포가 또한 제공된다. 그러한 세포는 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물을 확인하기 위한 약물 스크리닝 분석에서 이용된다. 생체외 결합 분석 및 전사계 분석을 비롯한 이들 분석에서는, sHASEGP에 의해 직접, 또는 프로-성장 인자의 활성화를 통해서와 같이 간접적으로 매개되는 시그널 전달이 평가된다.

[0036] 그러한 핵산 분자에 의해 암호된 펩티드가 또한 제공된다. 특이성 및/또는 하이알우로니다제 활성이 실질적으로 변하지 않고 남아 있는 아미노산 변화를 갖는 sHASEGP 하이알우로니다제 도메인 또는 폴리펩티드가 이들 폴리펩티드에 포함된다. 특히, 분비된 중성 촉매 활성을 포함하는 실질적으로 정제된 포유류 sHASEGP 당단백질이 제공된다.

[0037] 본 발명은 또한 하이알우로니다제 촉매 도메인을 포함하며 다른 도메인을 추가적으로 포함할 수도 있다. sHASEGP는 동종이량체를 형성할 수도 있으며 또한 막결합 단백질과 같은 일부 다른 단백질과 이종이량체를 형성할 수 있다. 또한 sHASEGP에 대하여 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 정제된 당단백질이 제공되며, 이때 퍼센티지 동일성은 퍼센티지 동일성을 최대화하는 갭 패널티 및 표준 알고리즘을 이용하여 결정된다.

[0038] sHASEGP의 스플라이스 변이체, 특히 촉매적 활성 하이알우로니다제 도메인을 갖는 것들이 여기서 고려된다.

[0039] 다른 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인 또는 촉매적으로 활성인 그 일부를 포함하지만 서열 번호 1에 개시된 아미노산의 전체 서열을 포함하지는 않는 실질적으로 정제된 폴리펩티드가 제공된다. 이들 중에는 서열 번호 1 또는 3에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드가 있다.

[0040] 특정 구체예에서는, sHASEGP로 표시되는, 진핵성 하이알우로니다제 당단백질을 암호하는 핵산이 제공된다. 특히, 핵산은 서열 번호 6에 개시된 뉴클레오티드의 서열, 특히 서열 번호 6의 뉴클레오티드 106-1446으로 개시된 서열, 또는 촉매적 활성 폴리펩티드를 암호하는 그 일부를 포함한다.

[0041] 적어도 낮은 엄격도, 일반적으로 온건한 엄격도, 더욱 일반적으로 높은 엄격도의 조건하에서 서열 번호 6 또는 그 축퇴물에 하이브리드하는 핵산 분자가 또한 제공된다.

[0042] 한 구체예에서, 분리된 핵산 단편은 높은 엄격도 조건하에서 서열 번호 6에 개시된 뉴클레오티드 서열(또는 그 축퇴물)을 함유하는 핵산 분자에 하이브리드한다. 전체-길이 sHASEGP는 서열 번호 1에 개시되며 서열 번호 6 또는 그 축퇴물에 의해 암호된다.

[0043] sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인의 뮤테인, 특히 자유로운, 즉 하이알우로니다제 도메인의 임의의 다른 Cys 잔기와 이황화 결합을 형성하지 않는, 하이알우로니다제 도메인의 Cys 잔기가 다른 아미노산 치환기, 반드시 그러하지는 않지만 일반적으로 보존적 아미노산 치환기 또는 활성을 제거하지 않는 치환기로 치환되는 뮤테인, 및 특정 당화 부위가 제거되는 뮤테인이 또한 제공된다.

[0044] 그 스플라이스 변이체를 포함하여 이에 한정되지 않는 sHASEGP 폴리펩티드, 및 sHASEGP, 그 도메인, 유도체 및 유사체를 암호하는 핵산이 여기서 제공된다. sHASEGP를 형성하기 위해 시그널 펩티다제의 활성화에 의해 생성되는 것과 기능적으로 등가인 N-말단을 갖는 단일쇄의 분비된 하이알우로니다제 당단백질이 또한 제공된다. 서열 번호 1에 예시된 sHASEGP의 N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490에서 7개의 잠재적인 N-결합된 당화 부위

가 있다. Cys 잔기 C60-C351 및 Cys 잔기 C224-C238 사이에서 이황화 결합이 형성되어 코어 하이알우로니다제 도메인을 형성한다. 하지만, 중성 효소 촉매 활성을 위해서는 카르복시 말단에서 추가의 시스테인이 필요하여 서열 번호 1의 아미노산 36 내지 Cys464의 sHASEGP가 최소 활성 사람 sHASEGP 하이알우로니다제 도메인을 포함한다. 따라서, N-결합된 당화 부위 N-490은 적절한 sHASEGP 활성에 필요하지 않다.

[0045] sHASEGP의 N-결합된 당화는 그들의 촉매 활성 및 안정성에 중요하다. 당단백질을 변형하는 글리칸 타입을 변화시키면 단백질의 항원성, 구조적 접힘, 가용성, 및 안정성에 극적인 영향을 줄 수 있지만, 대부분의 효소는 적절한 효소 활성을 위해 당화를 요구하지 않는 것으로 생각된다. 따라서 sHASEGP는 N-결합된 당화의 제거가 하이알우로니다제 활성의 거의 완전한 불활성화를 야기할 수 있다는 점에서 독특하다. N-결합된 글리칸의 존재는 활성 sHASEGP를 생성하는 데 중요하다. 중요한 N-결합된 당화 잔기를 sHASEGP에 도입하는 데 적합한 단백질 발현 시스템이 포함된다. 추가로, N-결합된 글리칸을 도입할 수 있는 추출물의 존재하에서 탈당화된 sHASEGP 폴리펩티드의 도입이 포함된다. 본 발명의 한 태양에서는, 시알화로 캡핑된 복잡한 당화가 개시되며 자유 만노즈 잔기로 캡핑된 다른 것들 또한 고려된다. 바람직하게는, 시알산 잔기는 sHASEGP에서 N-결합된 당화의 말단 잔기에서 발견된다.

[0046] N-결합된 올리고당은 몇 가지 주요 타입으로 나뉘며(올리고만노스, 복합체, 하이브리드, 황화), 이들 모두다 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 서열(여기서 Xaa는 Pro가 아님)내에 속하는, Asn 잔기의 아미드 질소를 통하여 부착된 (Man) 3-GlcNAc-GlcNAc-코어를 갖는다. -Asn-Xaa-Cys- 부위에서의 당화는 응집 단백질 C에 대해 보고되어 왔다. N-결합된 부위는 종종 서열 결정동안 "블랭크" 사이클의 출현으로 간접적으로 지정된다. 당화된 Asn을 Asp로 전환시키는 PNG아제 F에 의해 올리고당을 방출시킨 후 양성 확인이 이루어질 수 있다. PNG아제 F 방출 후, N-결합된 올리고당은 Bio-Gel P-6 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있으며, 올리고당 풀은 제조성 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC)에 노출된다 (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). 일부 올리고당 아이소머는 HPAEC를 이용하여 분리될 수 있다. 푸코스 잔기는 HPAEC 크로마토그램에서 용출 위치를 더 앞으로 이동시킬 것이며, 한편 추가의 시알산 잔기는 보유 시간을 증가시킬 것이다. 올리고당 구조가 공지된 당단백질(예, 소 페투인, a-1 산 당단백질, 난백알부민, RNAse B, 트랜스페린)을 동시에 처리하면 올리고당 피크의 지정을 촉진할 수 있다. 수집된 올리고당은 조성 분석 및 메틸화 결합 분석의 조합에 의해 특징을 규명하며 (Waeghe et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304), 이때 아노머 형태는 NMR 분광광도법에 의해 지정된다 (Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230).

[0047] sHASEGP의 제제가 또한 제공된다. sHASEGP는 동결건조 형태 및 안정화된 용액으로 조제될 수 있다. 칼슘, 마그네슘, 또는 나트륨과 같은 특정 금속 이온을 함유하는 제제는 중성 pH에서의 적절한 활성을 위해 유용하다. 안정화된 용액 제제에 더하여, 서방성 제제가 글리코스아미노글리칸의 연장된 제거를 위해 여기서 고려된다. 눈 안의 외과 수술 및 다른 적은 부피 수술을 위해 적은 부피의 sHASEGP를 투여하기 위한 sHASEGP의 예비 포장된 시린지를 제공하는 키트가 또한 여기서 제공된다. 인공수태술에 생체외 사용하기 위한 조화된 염 제제 또한 제공된다.

[0048] 글리코스아미노글리칸의 제거에서 sHASEGP의 사용 방법 또한 제공된다. sHASEGP는 글리코스아미노글리칸의 분해를 통하여 사이질 공간의 채널을 개방하여 500 nm 미만 크기의 분자의 확산을 허용한다. 이들 채널은 투여량 및 제제에 따라 24-48시간 동안 유지된다. 그러한 채널은 유체, 작은 분자, 단백질, 핵산 및 유전자 치료 벡터 및 500 nm 미만 크기의 다른 분자와 같은 외부에서 첨가된 분자의 확산을 촉진하기 위해 이용될 수 있다.

[0049] sHASEGP는 또한 허혈 재관류, 염증, 동맥경화증, 부종, 암, 척수 손상 및 상처의 다른 형태에 따라 발생하는 것들과 같은 과량의 글리코스아미노글리칸을 제거하기 위해 이용될 수 있다. 일부 경우에, sHASEGP는 정맥내 주입에 의해 전신성으로 전달될 수 있다. 이것은 심장 또는 뇌 또는 질병이 신체 전체에 걸쳐 있는 파종 종양의 경우와 같이 국소적 접근이 용이하지 않을 때 도움이 된다. 과-시알화된 sHASEGP는 말단 시알산이 없는 천연 하이알우로니다제 효소에 비하여 혈청 반감기와 분포를 증가시키기에 바람직하다.

[0050] 척수 손상, 녹내장, 및 성형 수술과 같은 일부 경우에는, 지연된 전달이 바람직하다.

[0051] 다른 경우에는, 한번의 짧게 작용하는 투여량이 바람직하다. 글리코스아미노글리칸의 일시적인 제거를 이용하여 용액 및 약물의 사이질 공간내로의 전달을 증가시킬 수 있다. 이것은 마취제의 확산 및 치료 액, 분자 및 단백질의 투여에 유용할 수 있다. sHASEGP의 존재하에서 분자의 피하 및 근육내 투여는 또한 그들의 전신성 분포를 더욱 신속하게 촉진한다. 그러한 방법은 정맥내 접근이 이용가능하지 않거나 또는 분자의 더욱 신속한 전신성 전달이 필요할 경우 매우 유용하다. 피하 투여시 생체이용률이 좋지 못한, 인자 VIII와 같은 다른 큰 분자의 전달은 그들의 이용가능성을 높이기 위해 sHASEGP와 함께 주사될 수 있다.

[0052] 난모세포를 둘러싼 큐물러스 매트릭스를 효소적으로 제거하기 위하여 sHASEGP를 이용하는 것이 제공된다. 추출물에서 유래된 하이알우로니다제의 독성 오염물이 없는 정제된 sHASEGP를 이용하여 큐물러스 매트릭스를 제거하면 보다 높은 생존가능성으로 난모세포를 부드럽게 회수할 수 있다. 또한, sHASEGP는 전염성 스폰지형태 뇌병증과 같은 바이러스 및 다른 병원균을 보유한 소 추출물 또는 다른 유기체를 사용하지 않고 제조될 수 있다.

[0053] 눈 안에서 사용하기 위해 작은 부피의 sHASEGP를 주사하는 것은 또한 작은 공간에 이용될 수도 있다. sHASEGP는 수술동안 투여되는 과량의 점탄성 기질을 제거하기 위해 눈의 전실내로 주사될 수 있다. sHASEGP의 눈속 주사는 또한 녹내장에서 눈속 압력을 감소시키기 위해, 유리체 응집물 또는 "부유물"을 용해시키기 위해, 또는 반상 퇴화의 치료를 위하여, 유리체 출혈을 제거하기 위해, 당뇨성 망막병증에서 유리체 망막 탈착을 촉진하기 위해, 그리고 다른 효소와 혼합되어 교정 렌즈를 따라 각막의 재성형을 촉진하기 위해 이용될 수 있다. 일부 경우에, 페길화(pegylated)-sHASEGP와 같은 오래 지속되는 sHASEGP의 사용이 바람직할 것임이 인식될 것이다.

[0054] 다른 물질과 sHASEGP의 공동 제제 또한 작은 부피 또는 신속한 피하 투여를 위한 주사가능한 펜스로 이용될 수 있다. Epipen®

, 인슐린, 및 다른 유체와 같은 예가 조제될 수 있다. 본 발명의 방법은 다른 치료 분자의 투여에 앞서, 그와 동시에 또는 그에 이어서 sHASEGP 폴리펩티드 또는 sHASEGP를 함유하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다. sHASEGP는 치료 분자의 투여 부위와 다른 부위에서 투여되거나 또는 sHASEGP는 치료 분자의 투여 부위와 동일한 부위에서 투여될 수 있다.

[0055] 따라서, sHASEGP로 표시되는 진핵성 분비 중성 활성 하이알우로니다제 당단백질 패밀리, 및 그 기능성 도메인, 특히 하이알우로니다제(또는 촉매) 도메인, 그 뮤테인 및 다른 유도체 및 유사체가 제공된다. sHASEGP를 암호하는 핵산이 여기서 제공된다. 질병 치료 및 조직 변형 효소로 사용하기 위한 상기 sHASEGP의 치료 용도 및 제제가 제공된다.

## *발명의 효과*

[0056] 본 발명은 신규의 가용성 중성 활성 하이알우로니다제 당단백질(sHASEGP)의 발견, 제조 방법, 및 다른 분자의 투여를 촉진하거나 글리코스아미노글리칸 관련 병리를 완화시키기 위한 그들의 용도에 관련된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0057] 도 1은 sHASEGP 벡터 HZ24의 벡터 지도이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0058] **A. 정의**

[0059] 달리 정의되지 않으면, 여기서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원의 전체 개시를 통하여 언급된 모든 특허, 특허 출원, 공개 출원 및 문헌, 진뱅크 서열, 웹사이트 및 다른 공개 재료는 달리 표시되지 않으면 그 전체가 참고로 본원에 통합된다. 여기서 용어의 정의가 다수 있는 경우, 이 섹션이 우선한다.

[0060] URL 또는 다른 그러한 확인자 또는 주소를 참고하는 경우, 그러한 확인자는 변할 수 있으며 인터넷상의 특정 정보가 오고 갈 수 있으나 동등한 정보가 인터넷을 조사함으로써 발견될 수 있음이 이해된다. 이들에 대한 참고는 그러한 정보의 이용가능성 및 공중에의 배포를 입증한다.

[0061] 본원에서 이용될 때, 임의의 보호기, 아미노산 및 다른 화합물의 약자는, 달리 표시되지 않으면, 그들의 일반적인 용법, 인정된 약자, 또는 생화학적 명칭에 대한 IUPAC-IUB 위원회를 따른다 ((1972) Biochem. 11: 942-944 참고).

[0062] 본원에서 사용된 것으로서, 진핵성 하이알우로니다제는 하이알우로니다제의 글루타메이트 잔기가 산-염기 촉매 기작을 통하여 하이알우로난과 콘드로이친 설페이트의 베타 1,4 결합을 가수분해하는, 글리코스아미노글리칸 엔도글루코사미니다제의 다양한 패밀리를 말한다.

[0063] 특히 관심이 가는 것은 사람을 비롯한 포유류 기원의 sHASEGP이다. 당업자는 일반적으로 폴리펩티드의 비 필수 영역에서 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않음을 인식한다 (예, Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224 참고).

[0064] 본원에서 사용된 것으로서, 막 고정된 sHASEGP는 여기서 개시된 것과 공통된 구조적 특징을 공유하는 막 고정된 하이알우로니다제의 패밀리를 말한다.

[0065] 본원에서 사용된 것으로서, 가용성 하이알우로니다제는 생리학적 상태하에서의 그 가용성을 특징으로 하는 폴리펩티드이다. 가용성 HASEGP는 예를 들어, 그것이 37℃로 가온된 트리톤 X-114의 수성상내로 분배되는 것에 의해 구별될 수 있다 (Bordier et al J Biol Chem. 1981 Feb 25; 256 (4): 1604-7). 한편 지질 고정된 HASEGP는 계면활성제가 풍부한 상내로 분배될 것이지만, 포스포리파제-C로 처리한 후에는 계면활성제가 적거나 수성인 상내로 분배될 것이다.

[0066] 따라서, 예를 들어, "sHASEGP"에 대한 언급은 사람 sHASEGP, 마우스 sHASEGP, 또는 임의의 다른 소스에서 얻어진 등가 분자, 또는 합성에 의해 제조되거나 동일한 활성을 나타내는 것을 포함하며 이에 한정되지 않는, sHASEGP 유전자 패밀리에 의해 암호되는 모든 당단백질을 포괄한다. 예시적인 sHASEGP 및/또는 그 도메인의 암호 핵산 분자의 서열 및 암호된 아미노산 서열은 예를 들어, 서열 번호 4에 개시된다. 상기 용어는 또한 각 멤버의 활성을 실질적으로 변화시키지 않는 아미노산 치환을 갖는 sHASEGP를 포함하며 또한 그 스플라이스 변이체를 포함한다. 반드시는 아니지만, 아미노산의 보존적 치환을 비롯한 적합한 치환이 공지되어 있으며 촉매 활성과 같은, 얻어진 분자의 생물학적 활성을 제거하지 않고 만들어질 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 것으로서, 여기서 언급될 때마다, sHASEGP는 서열 번호 6에 개시된 뉴클레오티드의 서열에 의해 또는 서열 번호 1의 아미노산 1-509를 암호하는 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드의 서열에 의해 암호되는 폴리펩티드; 낮은, 온건한 또는 높은 엄격도 조건하에서 서열 번호 6에 개시된 뉴클레오티드의 서열에 하이브리드하는 뉴클레오티드의 서열에 의해 암호되는 폴리펩티드; 서열 번호 1의 아미노산 1-509로 개시된 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열 번호 1에 개시된 아미노산의 서열 또는 서열 번호 4의 아미노산 1-448과 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드 중 적어도 하나 또는 전부 또는 임의의 조합을 포함한다.

[0068] 특히, 서열 번호 4에 표시된 하이알우로니다제 도메인을 갖는 sHASEGP 폴리펩티드가 제공된다. 상기 폴리펩티드는 단일쇄 또는 이중쇄 폴리펩티드이다. 하이알우로니다제 활성을 보유하는 보다 작은 그 일부 또한 제공된다. sHASEGP로부터의 하이알우로니다제 도메인은 표면 루프에서의 삽입 및 결실을 비롯하여, 크기 및 구성이 다양하다. 따라서, 여기서의 목적을 위하여, 촉매 도메인은 여기서 정의된 대로 sHASEGP의 일부이며, 이전에 확인된 HYAL1, HYAL2, HYAL3와 같은, 다른 하이알우로니다제형 서열의 도메인에 상동성이지만; 사람 하이알우로니다제 도메인의 분리된 단일쇄 형태가 생체외 분석에서 기능할 수 있음은 인식되지 않았다. 활성에 필요한 아스파테이트 및 글루타메이트 잔기는 보존된 모티프에 존재한다.

[0069] 본원에서 사용된 것으로서, "가용성 sHASEGP의 중성 하이알우로니다제 도메인"은 중성 pH에서 하이알우로니다제 활성을 나타내며 전술한 조건하에서 가용성이며 하이알우로니다제 글리코실-하이드롤라제 패밀리 도메인과 상동성 및 구조적 특징을 공유하지만 중성 활성에 필요한 카르복시 말단에서의 추가 서열을 함유하는, sHASEGP의 베타 1,4 엔도글루코사미니다제 도메인을 말한다. 따라서 이것은 표준 생체외 분석에 의해 평가할 때 하이알우로니다제 활성을 나타내며 가용성으로 있는 상기 도메인의 적어도 최소 부분이다. 그러한 하이알우로니다제 도메인 및 그것의 촉매적으로 활성인 일부가 여기서 고려된다. 단일쇄 형태로서 촉매적으로 작용하는 그것의 최소 단편을 포함하는 하이알우로니다제 도메인의 절단된 형태 또한 제공된다.

[0070] 여기서 언급될 때마다, sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인은 서열 번호 1에 개시된 아미노산의 서열을 포함하는 N-결합된 당단백질 폴리펩티드; 낮은, 온건한 또는 높은 엄격도 조건하에서 서열 번호 6에 개시된 뉴클레오티드의 서열에 하이브리드하는 뉴클레오티드의 서열에 의해 암호되는 폴리펩티드; 서열 번호 1로 개시된 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열 번호 1에 개시된 아미노산의 서열 과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 81%,82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및/또는 sHASEGP의 스플라이스 변이체에 의해 암호되는 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인의 적어도 하나 또는 모두 또는 임의의 조합 또는 촉매적으로 활성인 그 일부를 포함한다.

[0071] 따라서, 본 발명의 목적을 위하여, 하이알우로니다제 도메인은 여기서 정의된 대로, sHASEGP의 일부이며, 다른 sHASEGP의 도메인에 상동성이다. 하이알우로니다제 패밀리의 효소의 보다 큰 분류의 경우, sHASEGP 촉매 도메인은 높은 아미노산 서열 동일성을 공유한다. 활성에 필요한 Asp와 Glu 잔기는 보존된 모티프에 존재한다.

[0072] 활성 형태란 생체내 및/또는 생체외에서 활성인 형태를 의미한다. 여기서 개시된 대로, 하이알우로니다제 도메인은 또한 가용성의 분비된 당단백질로서 존재할 수 있다. 적어도 생체외에서, sHASEGP의 단일쇄 형태 및 그 촉매 도메인 또는 효소적으로 활성인 일부(일반적으로 C-말단 절단물)은 하이알우로니다제 활성을 나타내는 것으로 나타난다. 따라서 sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인의 분리 형태, 및 그 활성을 조절하는 제제의 확인을 위한 생체외 약물 스크리닝 분석에서의 그들의 용도가 여기서 제공된다.

[0073] 본원에서 사용된 것으로서, sHASEGP의 촉매적으로 활성인 도메인은 글리코스아미노글리칸 기질에 대한 생체외 활성에 의해 정의되는 중성 활성 엔도글루코스아미니다제 도메인을 말한다.

[0074] 대상 sHASEGP는 생체내 및 생체외에서 콘드로이친 설페이트 및 콘드로이친 설페이트 프로테오글리칸(CSPG)에 대해 활성인 것들; 및 하이알우로난에 대해 활성인 것들을 포함한다. 본원에서 사용된 것으로서, 사람 sHASEGP는 그들이 다른 포유류에서 발견되는 변이체가 아닌 한, 모든 대립유전자 변이체 및 보존적 변이체를 비롯한, 사람의 게놈에 존재하는, DNA와 같은 핵산에 의해 암호되는 것이다.

[0075] 본원에서 사용된 것으로서, sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인 또는 촉매적으로 활성인 일부를 암호하는 핵산은 언급된 단일쇄 하이알우로니다제 도메인 또는 그 활성 부분만을 암호하며 연속 서열로서 sHASEGP의 다른 인접 부분을 암호하지 않는 핵산을 말하는 것으로 이해되어야 한다.

[0076] 본원에서 사용된 것으로서, "질병" 또는 "질환"은 예를 들어 감염 또는 유전적 결함에서 기인하며 확인가능한 증상을 특징으로 하는 유기체의 병리학적 상태를 말한다.

[0077] 본원에서 사용된 것으로서, 스플라이스 변이체는 하나보다 많은 타입의 mRNA를 생성하는, DNA와 같은, 게놈 핵산의 일차 전사물의 차등 프로세싱에 의해 생성된 변이체를 말한다. sHASEGP의 스플라이스 변이체가 여기서 제공된다.

[0078] 본원에서 사용된 것으로서, sHASEGP 단백질의 하이알우로니다제 도메인은 중성 엔도글루코스아미니다제 활성을 나타내는 sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인을 말한다. 따라서 그것은 표준 생체외 분석에 의해 평가할 때 엔도글루코스아미니다제 활성을 나타내는 단백질의 적어도 최소 부분이다. 예시적인 사람 하이알우로니다제 도메인은 엔도글루코스아미니다제 활성을 나타내는 서열 번호 4에 개시된 아미노산 서열의 적어도 충분한 일부를 포함한다.

[0079] 또한 생체외 하이알우로니다제 분석에서 엔도글루코스아미니다제 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호하며, sHASEGP 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인의 전체-길이와 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖거나 또는 그들의 전체-길이를 따라 또는 전체-길이의 적어도 약 70%, 80% 또는 90%를 따라 온건한, 일반적으로는 높은, 엄격도의 조건하에서 하이알우로니다제 도메인을 암호하는 핵산에 하이브리드하는 핵산 분자가 고려된다.

[0080] 하이알우로니다제 도메인의 경우, N-말단 영역의 잔기는 중요하지만 활성에 충분하지는 않다. sHASEGP의 하이알우로니다제 도메인은 촉매적으로 활성인 것으로 나타난다. 따라서 하이알우로니다제 도메인은 일반적으로 활성을 위해 그들의 N-말단 아미노산을 필요로 하며; C-말단 부분은 마지막 시스테인 잔기가 적절히 활성이기 위해 추가의 아미노산을 필요로 할 때까지 절단될 수 있다. 제거될 수 있는 양은 촉매적 절단을 평가하는 생체외 분석에서 하이알우로니다제 활성에 대해 폴리펩티드를 시험함으로써 실험적으로 결정될 수 있다.

[0081] 따라서 하이알우로니다제 도메인의 더 작은 부분, 특히 하이알우로니다제 활성을 보유하는 그 단일쇄 도메인이 고려된다. 그러한 보다 작은 버젼은 일반적으로 하이알우로니다제 도메인의 C-말단 절단된 버젼이다. 하이알우로니다제 도메인은 표면 루프에서의 삽입 및 결실을 비롯하여, 크기 및 구성에서 다양하다. 그러한 도메인은 양성자 공여체와 같은 하나 이상의 구조적 특징 및/또는 엔도글루코스아미니다제의 하이알우로니다제 도메인의 다른 특징을 비롯하여 보존된 구조를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 목적을 위하여, 하이알우로니다제 도메인은 여기서 정의된 대로, sHASEGP의 단일쇄 부분이지만, 그 구조적 특징 및 다른 하이알우로니다제-유사 서열의 하이알우로니다제 도메인에 대한 유사성 또는 상동성의 서열 보유면에서는 상동성이다. 당단백질은 단일쇄로서 하이알우로니다제 활성을 나타낸다.

[0082] 본원에서 사용된 것으로서, 상동성이란 25% 40%, 60%, 70%,80%, 90% 또는 95%와 같은 약 25%를 초과하는 핵산 서열 동일성을 의미한다. 필요하면, 퍼센티지 상동성이 특정될 것이다. 용어 "상동성" 및 "동일성"은 종종 상호교환적으로 이용된다. 일반적으로, 서열은 가장 높은 차수의 매치가 얻어지도록 배열된다 (예를 들어, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988;

Biocomputing:Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part/, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 Sequence Analysis Primer,Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al.(1988) et al. (1988) Slam J Applied Math 48]: 1073 참고).

[0083] 서열 동일성에 의해, 보존된 아미노산의 수는 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 각 공급자에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티와 함께 이용된다. 실질적으로 상동성인 핵산 분자는 일반적으로 핵산의 길이를 따라 모두 또는 대상 핵산 분자의 전체-길이의 적어도 약 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 엄격도 또는 높은 엄격도에서 하이브리드할 것이다. 하이브리드하는 핵산 분자에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 핵산 분자 또한 고려된다.

[0084] 임의의 두 핵산 분자가 적어도 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다 (다른 프로그램은 GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST 기능을 이용하여 동일성을 결정할 수 있다. 다른 시판되거나 공개된 프로그램은 DNASTAR"MEGALIGN"PROGRAM (위스콘신주, 메디슨 소재) 및 위스콘신 대학 유전학 컴퓨터 그룹(UWG) "GAP" 프로그램(위스콘신주, 메디슨 소재)을 포함한다. 단백질 및/또는 핵산 분자의 퍼센트 상동성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 의해 개정된 대로, 예를 들어, Needleman et al. (1970),J Mol Biol.48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스; (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티; 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "아이덴티티"는 시험 및 기준 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 사이의 비교를 나타낸다.

[0085] 본원에서 사용된 것으로서, 용어 적어도 "90% 동일한"은 기준 폴리펩티드에 대하여 90 내지 99.99의 퍼센트 동일성을 말한다. 90% 이상의 동일성은 예시적인 목적을 가정하여 100 아미노산 길이의 시험 및 기준 폴리뉴클레오티드가 비교됨을 나타낸다. 시험 폴리펩티드의 10%(즉, 100개 중 10개) 미만의 아미노산이 기준 폴리펩티드와 상이하다. 유사한 비교를 시험 및 기준 폴리뉴클레오티드 사이에서 할 수 있다. 그러한 차이는 아미노산 서열 전체 길이에 걸쳐 임의로 분포된 점 돌연변이로서 나타내지거나 또는 그들은 허용가능한 최대치, 예, 10/100 아미노산 차이(약 90% 동일성)까지 변하는 길이의 하나 이상의 위치에서 모여있을 수 있다. 차이는 핵산 또는 아미노산 치환, 또는 결실로서 정의된다. 약 85-90%를 넘는 상동성 또는 동일성의 수준에서, 결과는 프로그램 및 정해진 파라미터와 무관하며; 그러한 높은 수준의 동일성은 쉽게, 종종 소프트웨어에 의존함 없이 평가될 수 있다.

[0086] 본원에서 사용된 것으로서, 프라이머는 둘 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 일반적으로 셋 이상을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 말하며, 이로부터 프라이머 연장 생성물의 합성이 시작될 수 있다. 합성에 유리한 실험 조건은 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합 및 연장을 위한 제제, 예, DNA 폴리머라제의 존재, 및 적합한 완충액, 온도 및 pH를 포함한다.

[0087] 본원에서 사용된 것으로서, 동물은 염소, 소, 사슴, 양, 설치류, 돼지 및 사람을 포함하며 이에 한정되지 않는 임의의 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 고려되는 동물에서 사람을 제외한다. 여기서 제공되는 sHASEGP는 임의의 소스, 동물, 식물, 원핵 및 진균류로부터 올 수 있다. 대부분의 sHASEGP는 포유류 기원을 비롯한 동물 기원이다.

[0088] 본원에서 사용된 것으로서, 유전자 치료법은 DNA와 같은 이종성 핵산을, 그러한 치료를 필요로 하는 질환 또는 상태를 가진 포유류,특히 사람의 일부 세포, 표적 세포내로 전달하는 것에 관련된다. DNA와 같은 핵산은 DNA와 같은 이종성 핵산이 발현되고 그에 의해 암호된 치료 생성물이 생산되도록 하는 방식으로 선택된 표적 세포내로

도입된다.

[0089] 다르게는, DNA와 같은 이종성 핵산은 일부 방식으로 치료 생성물을 암호하는 DNA의 발현을 매개하거나, 또는 일부 방식으로는 직접 또는 간접적으로 치료 생성물의 발현을 매개하는 펩티드 또는 RNA와 같은 생성물을 암호할 수 있다. 유전자 치료법은 또한 결함 유전자를 대신하거나 그것이 도입되는 포유류 또는 세포에 의해 생산된 유전자 생성물을 보충하는 유전자 생성물을 암호하는 핵산을 전달하기 위해 이용될 수 있다. 도입된 핵산은 정상적으로 포유류 숙주에서 생산되지 않거나 또는 치료적으로 유효량으로 생산되지 않거나 치료적으로 유용한 시간에서 생산되지 않는, 성장 인자 또는 그 억제자, 또는 종양 괴사 인자 또는 그 억제자, 예 그 수용체와 같은 치료 화합물을 암호할 수 있다. 치료 생성물을 암호하는 DNA와 같은 이종성 핵산은 생성물 또는 그 발현을 증가시키거나 또는 변화시키기 위해 숙주의 세포내로 도입하기 전에 변형될 수 있다. 유전자 치료법은 또한 유전자 발현의 억제자 또는 다른 조절자의 전달에 관련될 수 있다.

[0090] 본원에서 사용된 것으로서, 이종성 핵산은 그것이 발현되는 세포에 의해 정상적으로 생체내에서 생산되지 않거나 또는 전사, 번역, 또는 다른 조절가능한 생화학적 과정에 영향을 줌으로써 DNA와 같은 내인성 핵산의 발현을 변화시키는 매개자를 암호하거나 매개하는 핵산 및 (만일 DNA가 RNA를 암호하면) 단백질이다. DNA와 같은 이종성 핵산은 또한 DNA와 같은 외래 핵산으로 불릴 수 있다. 당업자가 세포에 대해 이종성 또는 외래인 것으로 인식하거나 간주하는 DNA와 같은 임의의 핵산은 여기서 이종성 핵산에 포함되며; 이종성 핵산은 또한 내인성으로 발현되는 외부에서 첨가된 핵산을 포함한다. 이종성 핵산의 예는 약물 내성을 부여하는 단백질과 같은 미량의 마커 단백질을 암호하는 핵산, 항암제, 효소 및 호르몬과 같은 치료적으로 효과적인 물질을 암호하는 핵산, 및 항체와 같은 다른 타입의 단백질을 암호하는 DNA와 같은 핵산을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 이종성 핵산에 의해 암호되는 항체는 이종성 핵산이 도입된 세포의 표면에서 발현되거나 분비될 수 있다.

[0091] 이종성 핵산은 일반적으로 그것이 도입되는 세포에 내인성이 아니며 다른 세포로부터 얻어지거나 합성으로 제조된다.

[0092] 반드시 그렇지는 않지만, 일반적으로, 그러한 핵산은 그것이 발현되는 세포에 의해 정상적으로 생산되지 않는 RNA와 단백질을 암호한다.

[0093] 본원에서 사용된 것으로서, 치료적으로 효과적인 생성물은, 핵산이 숙주 내로 도입될 때, 유전적 또는 후천적 질병의 증상, 확대를 완화하거나 제거하거나 그 질병을 치료하는 생성물이 발현되는, 이종성 핵산, 일반적으로 DNA에 의해 암호되는 생성물이다.

[0094] 본원에서 사용된 것으로서, 당단백질이 주로 하이알우로니다제 도메인으로 구성된다는 것은 폴리펩티드의 sHASEGP 부분만이 하이알우로니다제 도메인 또는 그 촉매적 활성 부분임을 의미한다. 폴리펩티드는 선택적으로, 그리고 일반적으로 추가의 비-sHASEGP-유래 서열의 아미노산을 포함할 것이다.

[0095] 본원에서 사용된 것으로서, 도메인은 구조적 및/또는 기능적으로 그 분자의 다른 부분과 구별되는 분자, 예를 들어 당단백질 또는 암호 핵산의 일부를 말한다.

[0096] 본원에서 사용된 것으로서, 하이알우로니다제는 글리코스아미노글리칸의 가수분해를 촉매하는 효소를 말한다.

[0097] 명확히 하기 위하여, 하이알우로니다제의 언급은 모든 형태를 말하는 것이며, 특정 형태는 구체적으로 표시될 것이다. 본 발명의 목적을 위하여, 하이알우로니다제 도메인은 sHASEGP 단백질의 막 결합 및 가용성 형태를 포함한다.

[0098] 본원에서 사용된 것으로서, 핵산은 DNA, RNA, 및 단백질 핵산(PNA)을 비롯한 그 유사체 및 그 혼합물을 포함한다. 핵산은 단일 또는 이중쇄일 수 있다. 선택적으로 형광 또는 방사성라벨과 같은 검출가능한 라벨로 표지된 프로브 또는 프라이머를 언급할 경우, 단일쇄 분자가 고려된다. 그러한 분자는 일반적으로 그들의 표적이 라이브러리를 탐침하거나 프라임하기 위해 통계적으로 독특하거나 낮은 카피수(일반적으로 5 미만, 대개 3 미만)를 갖는 길이이다. 일반적으로 프로브 또는 프라이머는 대상 유전자와 동일하거나 상보적인 서열의 적어도 14, 16 또는 30 인접 뉴클레오티드를 함유한다. 프로브와 프라이머는 10, 20, 30, 50, 100 또는 그 이상의 핵산 길이일 수 있다.

[0099] 여기서 이용할 때, sHASEGP의 단편 또는 일부를 암호하는 핵산은 sHASEGP의 언급된 단편 또는 일부만을 암호하며 sHASEGP의 다른 인접 부분은 암호하지 않는 핵산을 말한다.

[0100] 여기서 이용할 때, 프로모터, 인핸서, 전사 및 번역 정지 부위, 및 다른 시그널 서열과 같은 뉴클레오티드의 조절 및 효과인자 서열에의 이종성 핵산의 작동적 연결은 DNA와 같은 그러한 핵산과 그러한 뉴클레오티드 서열 간

의 관계를 말한다. 예를 들어, 프로모터에의 이종성 DNA의 작동적 연결은, 그러한 DNA의 전사가 판독 프레임으로 DNA를 특이적으로 인식하고 결합하고 전사하는 RNA 폴리머라제에 의해 프로모터로부터 개시되도록 하는 DNA와 프로모터 사이의 물리적 관계를 말한다. 따라서, 작동적으로 연결된 또는 작동가능하게 연합된은 프로모터, 인핸서, 전사 및 번역 정지 부위 및 다른 시그널 서열과 같은 뉴클레오티드의 조절 및 효과인자 서열과, DNA와 같은 핵산의 기능적 관계를 말한다. 예를 들어, 프로모터에의 DNA의 작동적 연결은 그러한 DNA의 전사가 DNA를 특이적으로 인식하고 결합하며 전사하는 RNA 폴리머라제에 의해 프로모터로부터 개시되도록 하는 DNA와 프로모터 사이의 물리적 및 기능적 관계를 말한다. 발현 및/또는 생체외 전사를 최적화하기 위하여, 여분의 잠재적인 부적절한 다른 번역 개시, 즉 전사 또는 번역 수준에서 발현을 방해 또는 감소시킬 수 있는 개시 코돈 또는 다른 서열을 제거하기 위하여 클론의 5' 비번역 부분을 제거, 첨가 또는 변화시키는 것이 필요할 수 있다. 다르게는, 컨센서스 리보좀 결합 부위(예, Kozak J. Biol. Chem. 266:19867-19870 (1991) 참고)가 개시 코돈의 5'에 삽입되어 발현을 개선할 수 있다. 그러한 변형이 바람직한지(또는 필요한지)는 실험적으로 결정될 수 있다.

[0101] 본원에서 사용된 것으로서, 안티센스 올리고뉴클레오티드를 참고하여, RNA의 적어도 일부에 상보적인 서열은 충분한 상보성을 가져, 중간 또는 높은 엄격도 조건하에서 RNA와 하이브리드하여 안정한 이중쇄를 형성할 수 있는 서열을 말하며; 이중쇄 sHASEGP 안티센스 핵산의 경우에는, 이중쇄 DNA(또는 dsRNA)의 단일쇄가 시험되거나 또는 삼중쇄 형성을 분석할 수 있다. 하이브리드하는 능력은 안티센스 핵산의 상보성 정도 및 길이에 의존한다. 일반적으로, 하이브리드하는 핵산의 길이가 길수록, 그것이 함유할 수 있으며 안정한 이중쇄(또는 가능한 경우에는, 삼중쇄)를 형성하는 sHASEGP 암호 RNA와 더 많은 염기 미스매치가 존재한다. 당업자는 하이브리드한 복합체의 융점을 결정하기 위하여 표준 과정을 이용하여 허용할 수 있는 미스매치 정도를 확인할 수 있다.

[0102] 본 발명의 목적을 위하여, 아미노산 치환은 생성된 단백질이 하이알우로니다제 활성을 나타내기만 하면 sHASEGP 및 그것의 하이알우로니다제 도메인 중 임의의 것에서 만들어질 수 있다. 고려되는 아미노산 치환은 표 1에 개시된 것과 같은 보존적 치환을 포함하며, 이것은 단백질 분해 활성을 제거하지 않는다. 여기서 개시된 대로, 절단 부위 및 기타 그러한 부위의 제거와 같은, 단백질의 특성을 바꾸는 치환 또한 고려되며; 그러한 치환은 일반적으로 비-보존적이지만 당업자에 의해 쉽게 이루어질 수 있다.

[0103] 아미노산의 적합한 보존적 치환은 당업자에게 공지되어 있으며 일반적으로 생성 분자의 생물학적 활성, 예를 들어 효소 활성을 변화시키지 않고 만들어질 수 있다. 당업자는 일반적으로 폴리펩티드의 비필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물 활성을 크게 바꾸지 않는다는 것을 인식한다 (예, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224 참고). sHASEGP의 촉매적 활성 단편, 특히 단일쇄 하이알우로니다제 부분 또한 정의내에 포함된다. 보존적 아미노산 치환은 예를 들어 하기와 같이 표 1에 개시된 것에 따라 만들어진다.:

[0104] 표 1. 원래 잔기 보존적 치환 Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R) Lys, orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gin (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gin Ile(I) Leu; Val; Met; Nle; Nva Leu (L); Val; Met; Nle; Nv Lys (K) Arg; Gin; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile; NLe Val Ornitine Lys; Arg Phe (F) Met; Leu; Tyr Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle; Nv.

[0105] 다른 치환 또한 허용가능하며 실험적으로 또는 공지의 보존적 치환에 따라 결정될 수 있다.

[0106] 본원에서 사용된 것으로서, Abu는 2-아미노부티르산이며; Orn은 오르니틴이다. 본원에서 사용된 것으로서, 여기서 나타나는 다양한 아미노산 서열에서 발생하는 아미노산은 그들의 공지의, 3-문자 또는 1-문자 약자에 따라 확인된다. 다양한 DNA 단편에서 발생하는 뉴클레오티드는 당업계에서 일상적으로 이용되는 단문자 표시에 따라 표시된다.

[0107] 본원에서 사용된 것으로서, 여기서 개시된 뉴클레오티드 서열에 기초한 프로브 또는 프라이머는 서열 번호 6의 적어도 10, 14, 일반적으로 적어도 16개의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 프로브는 서열 번호 6의 적어도 30, 50, 또는 100개의 인접한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 독특한 하이브리드화를 위한 프로브 또는 프라이머의 길이는 대상 게놈의 복잡성의 함수이다.

[0108] 본원에서 사용된 것으로서, 특정 약학 조성물의 투여에 의한 특정 질환의 증상의 완화는, 영구적이건 일시적이건, 상기 조성물의 투여에 기인하거나 이에 연관될 수 있는 지속적이거나 일시적인, 임의의 감소를 말한다.

[0109] 본원에서 사용된 것으로서, 안티센스 폴리뉴클레오티드는 mRNA 또는 이중쇄 DNA의 센스 쇄에 상보적인 뉴클레오티드 염기의 합성 서열을 말한다. 적절한 조건하에서 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오티드의 혼합물은 두 분자의 결합, 즉 하이브리드화를 야기한다. 이들 폴리뉴클레오티드가 mRNA와 결합(하이브리드)할 때, 단백질

합성(번역)의 억제가 일어난다. 이들 폴리뉴클레오티드가 이중쇄 DNA에 결합할 때, RNA 합성(전사)의 억제가 일어난다.

[0110] 번역 및/또는 전사의 결과적인 억제는 센스 쇄에 의해 암호되는 단백질의 합성의 억제를 야기한다. 안티센스 핵산 분자는 표적 핵산에 특이적으로 결합하기에 충분한 수의 뉴클레오티드를 함유하며, 일반적으로 대상 유전자를 암호하는 핵산 분자, 예를 들어 sHASEGP의 단일쇄 하이알우로니다제 도메인을 암호하는 핵산의 암호 부분에 상보적인, 대개 적어도 5 인접 뉴클레오티드, 종종 적어도 14 또는 16 또는 30 인접 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 암호한다.

[0111] 본원에서 사용된 것으로서, 어레이는 셋 이상의 구성원을 함유하는, 항체와 같은 요소의 수집체를 말한다. 확인가능한 어레이는 어레이의 구성원이 일반적으로 고체상 지지체에서의 위치에 의해 확인가능한 것이다. 따라서, 일반적으로 어레이의 구성원들은 고체상의 표면상에 분별가능한 확인가능한 위치에 고정된다.

[0112] 본원에서 사용된 것으로서, 항체는 천연이건 또는 부분적 또는 전체적으로 합성되어 생산되었건 간에, 항체의 특이적 결합 능력을 보유한 그 임의의 유도체를 비롯한 면역글로불린을 말한다. 따라서, 항체는 면역글로불린-결합 도메인에 상동성이거나 실질적으로 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 비롯한 임의의 면역글로불린 부류의 구성원을 포함한다.

[0113] 본원에서 사용된 것으로서, 항체 단편은 전체-길이 항체의 특이적 결합 능력의 적어도 일부를 보유한, 전체-길이 미만인 항체의 임의 유도체를 말한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(AB)2, 단일쇄 Fvs(scFV), FV, dsFV 다이아바디 및 Fd 단편을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 단편은 이황화 결합에 의해서와 같이, 연결된 다중쇄를 포함할 수 있다. 항체 단편은 일반적으로 적어도 약 50 아미노산을 함유하며 일반적으로 적어도 200 아미노산을 함유한다.

[0114] 본원에서 사용된 것으로서, Fv 항체 단편은 비공유 결합에 의해 연결된 하나의 가변성 중쇄 도메인(VH)과 하나의 가변성 경쇄 도메인으로 구성된다.

[0115] 본원에서 사용된 것으로서, dsFV는 조작된 분자간 이황화 결합을 가진 Fv를 말한다.

[0116] 본원에서 사용된 것으로서, F(AB)2 단편은 pH 4.0-4.5에서 펩신으로 면역글로불린을 분해하여 생기는 항체 단편이며; 등가 단편을 생산하기 위하여 재조합적으로 발현될 수 있다.

[0117] 본원에서 사용된 것으로서, Fab 단편은 파파인으로 면역글로불린을 분해하여 생기는 항체 단편이며; 등가 단편을 생산하기 위하여 재조합적으로 발현될 수 있다.

[0118] 본원에서 사용된 것으로서, scFv는 임의의 순서로 폴리펩티드 링커에 의해 공유 결합된 가변 경쇄 V, 및 가변 중쇄(VH)를 함유하는 항체 단편이다. 상기 링커는 두 가변 도메인이 실질적 간섭없이 결합되는 길이이다. 포함되는 링커는 일부 Glu 또는 Lys 잔기가 용해성을 증가시키기 위해 전체에 퍼져 있는 (Gly-Ser)n 잔기이다.

[0119] 본원에서 사용된 것으로서, 인간화 항체는 아미노산의 사람 서열을 포함하도록 변형되어 사람에의 투여가 면역반응을 야기하지 않는 항체를 말한다. 그러한 항체의 제조 방법은 알려져 있다. 예를 들어, 그러한 항체를 생산하기 위해, 모노클로날 항체를 발현하는, 이.콜리 또는 CHO 세포와 같은 하이브리도마 또는 다른 원핵 또는 진핵 세포는 재조합 DNA 기법에 의해 변화되어 비가변 영역의 아미노산 조성이 사람 항체에 기초한 항체를 발현한다. 컴퓨터 프로그램은 그러한 영역을 확인하도록 고안되었다.

[0120] 본원에서 사용된 것으로서, 다이아바디는 이량체 scFV이며; 다이아바디는 일반적으로 ScFV보다 짧은 펩티드 링커를 가지며, 이들은 일반적으로 이량체화된다.

[0121] 본원에서 사용된 것으로서, 재조합 DNA 방법을 이용하는 재조합 수단에 의한 생산은 클론된 DNA에 의해 암호된 단백질을 발현하기 위한 분자 생물학 방법을 이용하는 것을 의미한다.

[0122] 본원에서 사용된 것으로서, 용어 평가는 샘플에 존재하는 sHASEGP 또는 그 도메인의 활성에 대해 절대값을 얻고 또한 활성의 수준을 나타내는 지수, 비율, 퍼센티지, 시각적 또는 다른 값을 얻는 의미에서 질적 및 양적 측정을 포함한다. 평가는 직접 또는 간접적일 수 있으며 실제로 검출되는 화학종은 물론 그 자체가 단백질 분해 생성물일 필요가 없으며 예를 들어 그 유도체 또는 일부 추가 물질일 수 있다.

[0123] 본원에서 사용된 것으로서, 생물 활성은 화합물의 생체내 활성 또는 화합물, 조성물 또는 다른 혼합물의 생체내 투여시 생기는 생리학적 반응을 말한다. 따라서, 생물 활성은 그러한 화합물, 조성물 및 혼합물의 치료 효과 및 약학적 활성을 포함한다. 생물 활성은 그러한 활성을 시험하거나 이용하기 위해 고안된 생체외 시스템에서 관찰

될 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적을 위하여 루시퍼라제의 생물 활성은 기질의 산화시 빛이 생산되는 옥시게나제 활성이다.

[0124] 본원에서 사용된 것으로서, 기능적 활성은 전체-길이 단백질과 관련된 하나 이상의 활성을 나타내는 폴리펩티드 또는 그 일부를 말한다.

[0125] 기능적 활성은 생물 활성, 촉매 또는 효소 활성, 항원성(항-폴리펩티드 항체에 결합하거나 결합에 대해 폴리펩티드와 경쟁하는 능력), 면역원성, 다량체를 형성하는 능력, 폴리펩티드를 위한 수용체 또는 리간드에 특이적으로 결합하는 능력을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0126] 본원에서 사용된 것으로서, 접합체는 sHASEGP를 비롯한, 하나 이상의 sHASEGP, 특히 단일쇄 하이알우로니다제 도메인, 및 하나 이상의 표적화제를 포함하는 여기서 제공된 화합물을 말한다. 이들 접합체는 융합 단백질로서 재조합 수단에 의해 생산된 것들, 예를 들어 설프히드릴기에의 커플링을 통해서와 같은 화학적 커플링에 의한 것과 같은 화학적 수단에 의해 생산된 것들, 및 하나 이상의 sHASEGP 또는 그 도메인이 직접 또는 링커를 통하여 간접적으로 표적화제에 연결되는 임의의 다른 방법에 의해 생산된 것들을 포함한다.

[0127] 본원에서 사용된 것으로서, 표적화제는 접합체 또는 그 sHASEGP 부분을 내부화할 수 있는 세포 표면 수용체에의 접합체의 특이적 결합을 제공하는 단백질 또는 그 유효 부분과 같은 임의의 부분이다. 표적화제는 또한 예를 들어, 접합체의 친화성 분리 또는 정제; 표면에의 접합체의 부착; 또는 접합체 또는 접합체를 함유하는 복합체의 검출을 증진 또는 촉진하는 것일 수 있다.

[0128] 본원에서 사용된 것으로서, 항체 접합체는 표적화제가 항체인 접합체이다.

[0129] 본원에서 사용된 것으로서, 분자의 유도체 또는 유사체는 분자에서 유래된 부분 또는 분자의 변형된 버젼을 말한다.

[0130] 본원에서 사용된 것으로서, 특정 질병을 치료하기 위한 화합물의 유효량은 그 질병과 관련된 증상을 완화시키거나 또는 일부 방식으로는 감소시키기에 충분한 양이다. 그러한 양은 단일 투여량으로 투여되거나 또는 효과적인 요법에 따라 투여될 수 있다. 상기 양은 질병을 치료할 수 있으나, 일반적으로 질병의 증상을 완화시키기 위해 투여된다. 증상의 원하는 완화를 이루기 위해 반복 투여가 필요할 수도 있다.

[0131] 본원에서 사용된 것으로서, 핵산의 두 서열을 말할 때, 등가물은 두 서열이 동일한 아미노산 서열 또는 등가의 단백질을 암호함을 의미한다. 등가물을 두 단백질 또는 펩티드를 말할 때 이용하면, 그것은 두 단백질 또는 펩티드가 그 단백질 또는 펩티드의 활성 또는 기능을 실질적으로 변화시키지 않는 아미노산 치환(예, 상기 표1에 개시된 것과 같은 보존적 변화 등)만을 갖는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가짐을 의미한다. 등가물이 특성을 가리킬 경우, 그 특성은 동일한 정도로 존재할 필요는 없으나(예, 두 펩티드가 동일한 타입의 효소 활성을 다른 속도로 나타낼 수 있음), 활성은 대개 실질적으로 동일하다. 두 뉴클레오티드 서열을 말할 때, 상보적이라는 것은 두 뉴클레오티드 서열이 일반적으로 대치되는 뉴클레오티드간에 25%, 15%, 5% 또는 0% 미만의 미스매치로 하이브리드할 수 있음을 의미한다. 필요하다면, 상보성의 퍼센티지가 특정될 것이다. 일반적으로 두 분자는 그들이 높은 엄격도 조건하에서 하이브리드하도록 선택된다.

[0132] 본원에서 사용된 것으로서, 단백질의 활성 또는 유전자 또는 핵산의 발현을 조절하는 제제는 단백질의 활성을 감소 또는 증가시키거나 또는 다르게는 변화시키며, 또는 일부 방식으로 세포에서 핵산의 발현을 상향 또는 하향 조절하거나 다르게는 변화시킨다.

[0133] 본원에서 사용된 것으로서, sHASEGP의 활성의 억제자는 생체외 스크리닝 분석에서 특히 단일쇄 형태의, sHASEGP의 생산, 번역후 변형, 성숙, 또는 막 국소화를 금지 또는 감소시키는 임의 물질 또는 그 단백질분해 효능을 방해하거나 감소시키는 임의의 물질을 포함한다.

[0134] 본원에서 사용된 것으로서, 종양 질병을 치료하거나 방지하는 방법은 종양, 그 전이, 종양의 유관화 또는 질병이 특징지어질 수 있는 다른 파라미터와 같은 임의의 증상이 감소, 완화, 방지되거나, 경감 상태에 놓이거나, 또는 경감 상태로 유지되는 것을 말한다. 또한 종양 질병 및 전이의 특징이 치료에 의해 제거, 감소 또는 방지될 수 있음을 의미한다. 특징의 비제한적인 예는 기저막 및 기부 세포외 매트릭스의 비조절성 분해, 새로운 기능성 모세혈관으로 내피 세포의 이동, 분열 및 조직화, 및 그러한 기능성 모세혈관의 지속을 포함한다.

[0135] 본원에서 사용된 것으로서, 접합체의 약학적 허용염, 에스테르 또는 다른 유도체는 그러한 유도체화를 위한 공지의 방법을 이용하여 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있으며 실질적인 독성 효과없이 동물 또는 사람에게 투여될 수 있는 화합물을 생산할 수 있으며 약학적 활성물이거나 프로드러그인 임의의 염, 에스테르 또는 유도체를

포함한다.

[0136] 본원에서 사용된 것으로서, 프로드러그는 생체내 투여시 대사되거나 또는 다르게는 화합물의 생물학적, 약학적 또는 치료적 활성 형태로 전환되는 화합물이다. 프로드러그를 생산하기 위하여, 약학적 활성 화합물은 활성 화합물이 대사 과정에 의해 재생되도록 변형된다. 프로드러그는 약물의 대사적 안정성 또는 수송 특성을 변화시키기 위해, 부작용 또는 독성을 차단하기 위해, 약물의 향을 개선하기 위해 또는 약물의 다른 특징 또는 특성을 변화시키기 위해 디자인될 수 있다. 약력학적 과정 및 생체내 약물 대사에 대한 지식에 의해, 당업자는 일단 약학적 활성 화합물이 공지되면, 화합물의 프로드러그를 고안할 수 있다 (예, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, p388-392).

[0137] 본원에서 사용된 것으로서, 여기서 제공된 스크리닝 방법에 의해 확인된 약물은 치료제로서 또는 치료제의 고안을 위한 리딩 화합물로서 사용하기 위한 후보자인 임의의 화합물을 말한다. 그러한 화합물은 작은 유기 분자, 펩티드, 펩티드 모방체, 안티센스 분자 또는 RNAi와 같은 dsRNA, 항체, 항체 단편, 재조합 항체 및 약물 후보 또는 선도 화합물로 작용할 수 있는 다른 그러한 화합물을 비롯한 작은 분자일 수 있다.

[0138] 본원에서 사용된 것으로서, 펩티도 모방체는 특정 펩티드의 생물학적 활성 형태의 배열 및 일부 입체화학적 특징을 모방하는 화합물이다. 일반적으로, 펩티드 모방체는 화합물의 일부 바람직한 특성은 모방하되, 생물학적으로 활성인 형태의 소실 및 결합 파괴를 야기하는 유연성과 같은 바람직하지 않은 특성을 모방하지 않도록 고안된다. 펩티드 모방체는 바람직하지 않은 특성에 기여하는 일부 기 또는 결합을 바이오아이소스테레(bioisostere)로 대신함으로써 생물학적 활성 화합물로부터 제조될 수 있다. 바이오이소스테레는 공지되어 있다. 예를 들어 메틸렌 바이오이소스테레 CH2S는 엔케팔린 유사체에서 아미드 치환체로 사용되었다 (예, Spatola(1983) pp. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weistein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York 참고). 경구투여될 수 있는 모르핀은 펩티드 엔돌핀의 펩티드모방체인 화합물이다. 본 발명의 목적을 위하여, 시클릭 펩티드는 펩티드모방체에 포함된다.

[0139] 본원에서 사용된 것으로서, 프로모터 영역 또는 프로모터 요소는 그것이 작동적으로 연결되는 DNA 또는 RNA의 전사를 조절하는 DNA 또는 RNA의 분절을 말한다. 프로모터 영역은 RNA 폴리머라제 인식, 결합 및 전사 개시에 충분한 특이적 서열을 포함한다.

[0140] 프로모터 영역의 이 부분은 프로모터로 불린다. 또한, 프로모터 영역은 RNA 폴리머라제의 이러한 인식, 결합 및 전사 개시 활성을 조절하는 서열을 포함한다. 이들 서열은 시스 작용하거나 또는 트랜스 작용 인자에 반응할 수 있다. 프로모터는 조절의 특성에 따라, 구성적이거나 조절될 수 있다. 원핵생물에서 사용하기 위해 고려되는 예시적인 프로모터는 박테리오파아지 T7 및 T3 프로모터를 포함한다.

[0141] 본원에서 사용된 것으로서, 수용체는 주어진 리간드에 대해 친화성을 갖는 분자를 말한다. 수용체는 자연 발생 또는 합성 분자일 수 있다. 수용체는 또한 당업계에서 항-리간드로 불린다. 본원에서 사용된 것으로서, 수용체 및 항-리간드는 상호교환적이다. 수용체는 그들의 비변화 상태로 또는 다른 종과의 응집체로서 사용될 수 있다. 수용체는 특이적 결합 물질 또는 링커를 통해 간접적으로 또는 직접적으로, 결합 구성원에 공유적 또는 비공유적으로 부착하거나 또는 물리적 접촉할 수 있다. 수용체의 예는 항체, 세포막 수용체 표면 수용체 및 내부화 수용체, 바이러스, 세포, 또는 다른 물질상의 특이적 항원성 결정인자와 반응성인 모노클로날 항체 및 항혈청, 약물, 폴리뉴클레오티드, 핵산, 펩티드, 인자, 렉틴, 당, 다당류, 세포, 세포막, 및 기관을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0142] 수용체 및 그러한 수용체를 이용한 용례의 예는 하기를 포함하며 이에 한정되지 않는다: a) 효소: 항생제 (리간드) 선별을 위한 표적으로 작용할 수 있는, 특이적 수송 단백질 또는 미생물의 생존에 필수적인 효소; b) 항체: 대상 항원의 에피토프와 결합하는 항체 분자상의 리간드-결합 부위의 확인이 조사될 수 있으며;항원성 에피토프를 모방하는 서열의 결정은 면역원이 그러한 서열 하나 이상에 기초하는 백신의 개발로 이끌거나 또는 자가면역 질병을 위한 것과 같은 치료에 유용한 관련 진단제 또는 화합물의 개발로 이끌며; c) 핵산: 단백질 또는 RNA와 같은 리간드, 결합 부위의 확인; d) 촉매적 폴리펩티드: 하나 이상의 반응물을 하나 이상의 생성물로 전환시키는 것에 관련된 화학 반응을 촉진할 수 있는 폴리펩티드를 비롯한 중합체; 그러한 폴리펩티드는 대개 하나 이상의 반응물 또는 반응 중간체에 대해 특이적인 결합 부위 및 결합 부위에 인접한 활성 기능기를 포함하며 이때 기능기는 결합된 반응물을 화학적으로 변형시킬 수 있으며(예, 미국 특허 제5,215,899호 참고); e) 호르몬 수용체: 수용체에 고 친화성으로 결합하는 리간드의 결정은 호르몬 대체 요법의 개발에 유용하며; 예를 들어, 그러한 수용체에 결합하는 리간드의 확인은 혈압 조절 약물의 개발로 이끌 수 있으며; 그리고 f) 마취제 수용체: 뇌에서 마취제 수용체에 결합하는 리간드의 결정은 모르핀 및 관련 약물을 위한 덜 중독성인 대체물의 개발에 유

용하다.

[0143] 본원에서 사용된 것으로서, 샘플은 애널라이트 분석이 필요한 애널라이트를 함유할 수 있는 임의의 것을 말한다. 샘플은 생물 유체 또는 생물 조직과 같은 생물 샘플일 수 있다. 생물 유체의 예는 소변, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 담, 척수액, 눈물, 점액, 정자, 양막액 등을 포함한다. 생물 조직은 대개 특정 종류의 세포와 연결, 상피, 근육 및 신경 조직을 비롯한, 사람, 동물, 식물, 박테리아, 진균 또는 바이러스 구조의 구조적 물질 중 하나를 형성하는 그들의 세포간 물질의 응집체이다. 생물 조직의 예는 또한 기관, 종양, 림프절, 동맥 및 개별 세포를 포함한다.

[0144] 본원에서 사용된 것으로서, 퍼센티지 미스매치를 결정할 때 하이브리드화의 엄격도는 다음과 같다: 1) 높은 엄격도: 0.1 x SSPE, 0.1 % SDS, 65℃ 2) 중간 엄격도: 0.2 x SspE, 0.1 % SDS, 50℃ 3) 낮은 엄격도: 1.0 x SspE, 0.1 % SDS, 50℃. 당업자는 세척 단계가 안정한 하이브리드를 선택함을 알며 또한 SspE의 성분을 안다(예, Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory Press 1989 Vol 3, p. B. 13을 참고하며, 또한 흔히 이용되는 실험 용액을 개시하는 많은 카타로그를 참고함). SspE는 pH 7.4 포스페이트 완충된 0.18 NaCl이다. 또한, 당업자는 하이브리드의 안정성이 나트륨 이온 농도 및 온도의 함수인 TmT에 의해 결정되며(Tm = 81.5℃-16.6 + 0.41 (% G+C) -600/L)) 하이브리드 안정성에 중요한 세척 조건의 유일한 파라미터가 SspE(또는 SSC)에서 나트륨 이온 농도 및 온도임을 인식한다.

[0145] 동등한 엄격도가 다른 완충액, 염 및 온도를 이용하여 이루어질 수 있는 것으로 이해된다. 비제한적인 예시로서, 낮은 엄격도의 조건을 이용하는 과정은 다음과 같다 (또한 Shilo and Weinberg, Proc. Natl. Acad Sci USA 78: 6789-6792 (1981) 참고): DNA를 함유하는 필터를 35% 포름아미드, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.1 % PVP, 0.1 % Ficoll, 1% BSA, 및 500 ㎍/ml 변성된 연어 정자 DNA (10x)를 함유하는 용액에서 40℃에서 6시간 동안 예비처리한다. SSC는 1.5 M 염화나트륨, 및 0.15 M 소듐 시트레이트이며 pH 7로 조절된다.

[0146] 하이브리드화는 하기 변형을 갖는 동일한 용액에서 실시된다: 0.02% PVP, 0.02% Ficoll 0.2% BSA, 100VG/M 정자 DNA, 10% (wt/vol) 덱스트란 설페이트, 및 5-20 X 106 cpm 32P-표지된 프로브를 이용한다. 필터는 40℃에서 18-20시간 동안 하이브리드화 혼합물에서 항온처리되며 이어서 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 및 0.1 % SDS를 함유하는 용액에서 55℃에서 1.5시간 동안 세척한다. 세척 용액을 새로운 용액으로 대체하고 60℃에서 1.5시간 동안 항온처리한다. 필터를 블롯 건조시키고 방사선 사진촬영술에 노출시킨다. 필요하면, 필터를 65-68℃에서 세번째 세척하고 필름에 재노출시킨다. 이용될 수 있는 낮은 엄격도의 다른 조건은 예를 들어, 교차종 하이브리드화에 이용되는 대로 공지되어 있다.

[0147] 비제한적인 예로서, 온건한 엄격도의 조건을 이용하는 과정은 예를 들어, 온건한 엄격도의 조건이 하기와 같은 과정을 포함하며 이에 한정되지 않는다: DNA를 함유하는 필터를 6X SSC, 5X 덴하르트 용액, 0.5% SDS 및 100 ㎍/ml 변성 연어 정자 DNA를 함유하는 용액에서 55℃에서 6시간 동안 예비처리한다. 하이브리드화는 동일한 조건에서 실시하고 5-20 X 106 32P 표지된 프로브를 이용한다. 필터를 55℃에서 18-20시간 동안 하이브리드화 혼합물에서 항온처리하며 이어서 1X SSC 및 0.1% SDS를 함유한 용액에서 60℃에서 30분동안 두번 세척한다. 필터를 블롯 건조시키고 방사선사진촬영술에 노출시킨다. 이용될 수 있는 온건한 엄격도의 다른 조건은 공지되어 있다. 필터의 세척은 2X SSC 및 0.1% SDS를 함유한 용액에서 37℃에서 1시간 동안 이루어진다.

[0148] 비제한적인 예로서, 높은 엄격도의 조건을 이용하는 과정은 하기와 같다: DNA를 함유하는 필터의 예비하이브리드화는 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 및 500 ㎍/ml 변성 연어 정자 DNA로 구성된 완충액에서 65℃에서 8시간 내지 밤새 실시한다. 필터는 100 ㎍/ml 변성 연어 정자 DNA 및 5-20 X 106 32P 표지된 프로브를 함유하는 예비하이브리드화 혼합물에서 65℃에서 48시간 동안 하이브리드화시킨다. 필터의 세척은 2X SSC, 0.01 % PVP, 0.01 % Ficoll, 및 0.01 % BSA를 함유하는 용액에서 1시간 동안 37℃에서 이루어진다. 이어서 방사선사진술에 앞서 45분동안 50℃에서 0.1X SSC에서의 세척이 이루어진다. 이용될 수 있는 높은 엄격도의 다른 조건은 공지되어 있다.

[0149] 용어 실질적으로 동일한 또는 실질적으로 상동성이거나 유사한은 관련 분야의 당업자가 이해하는 것처럼 내용에 따라 다르며 적어도 60% 또는 70%를 의미하며, 바람직하게는 적어도 80%, 85%, 또는 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 95% 동일성을 의미한다.

[0150] 본원에서 사용된 것으로서, 생성물에 실질적으로 동일하다라는 것은 대상 특성이 충분히 불변하여 실질적으로

동일한 생성물이 그 생성물 대신 이용될 수 있을 정도로 충분히 유사함을 의미한다.

[0151] 본원에서 사용된 것으로서, 실질적으로 순수하다란 것은 그러한 순도를 평가하기 위해 당업자가 이용하는, 박층 크로마토그래피(TLC), 젤 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 표준 분석 방법에 의해 결정할 때 쉽게 검출가능한 불순물이 나타나지 않도록 충분히 균질하거나, 또는 추가 정제가 그 물질의 효소 및 생물 활성과 같은 물리적 및 화학적 특성을 검출가능하게 변화시키지 않을 정도로 충분히 순수함을 의미한다. 실질적으로 화학적으로 순수한 화합물을 생산하기 위해 화합물을 정제하는 방법은 공지되어 있다. 하지만, 실질적으로 화학적으로 순수한 화합물은 입체이성질체 또는 이성질체의 혼합물일 수 있다. 그러한 예에서, 추가 정제는 화합물의 비활성을 증가시킬 수도 있다.

[0152] 본원에서 사용된 것으로서, 표적 세포는 생체내에서 sHASEGP를 발현하는 세포를 말한다.

[0153] 본원에서 사용된 것으로서, 시험 물질(또는 시험 화합물)은, 여기서 제공된 분석과 같은, 생체외 방법에 의해 결정할 때, sHASEGP, 특히 하이알우로니다제 도메인 또는 활성에 충분한 그 일부를 포함하는 단일쇄 형태에 영향을 미치는, 화학적으로 정의된 화합물(예, 유기 분자, 무기 분자, 유기/무기 분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 올리고뉴클레오티드, 지질, 다당류, 당류 또는 당단백질과 같은 이들 분자간의 하이브리드 등)또는 화합물의 혼합물(예, 시험 화합물, 천연 추출물 또는 배양 상등액의 라이브러리 등)을 말한다.

[0154] 본원에서 사용된 것으로서, 용어 치료제, 치료 요법, 방사성보호 또는 화학치료제는 당업자에게 공지된, 백신을 비롯한, 종래 약물 및 약물 요법을 말한다. 방사성치료제는 공지되어 있다.

[0155] 본원에서 사용된 것으로서, 치료는 상태, 질환 또는 질병의 증상이 완화되거나 또는 다르게는 유익하게 바뀔 수 있는 임의의 방식을 의미한다.

[0156] 치료는 또한 본 조성물의 임의의 약학적 용도를 포괄한다.

[0157] 본원에서 사용된 것으로서, 벡터(또는 플라스미드)는 이종성 핵산을 그 발현 또는 복제를 위해 세포내로 도입하기 위해 이용되는 별도의 요소를 말한다. 벡터는 일반적으로 에피좀으로 남아 있으나, 게놈의 유전자 또는 그 일부의 염색체내로의 통합을 일으키도록 고안될 수 있다. 효모 인공 염색체 및 포유류 인공 염색체와 같은 인공 염색체인 벡터도 고려된다. 그러한 비히클의 선택 및 사용은 공지되어 있다. 발현 벡터는 그러한 DNA 단편의 발현을 일으킬 수 있는, 프로모터 영역과 같은 조절 서열과 작동적으로 연결된 DNA를 발현할 수 있는 벡터를 포함한다. 따라서, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포내로 도입시 클론된 DNA의 발현을 야기하는 플라스미드, 파아지, 재조합 바이러스 또는 다른 벡터와 같은 재조합 DNA 또는 RNA 구조체를 말한다. 적절한 발현 벡터는 당업계에 공지되어 있으며 진핵 세포 및/또는 원핵 세포에서 복제가능한 것들 및 에피좀으로 있는 것들 또는 숙주 세포 게놈내로 통합되는 것들을 포함한다.

[0158] 본원에서 사용된 것으로서, 단백질 결합 서열은 다른 단백질 또는 펩티드 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 펩티드 서열, 단백질 또는 펩티드 서열의 세트 또는 특정 단백질 또는 펩티드 서열을 가리킨다.

[0159] 본원에서 사용된 것으로서, 에피토프 태그는 에피토프 태그가 붙은 단백질 또는 펩티드의 생화학적 및 면역학적 분석을 촉진하기 위한 에피토프에 해당하는 아미노산 잔기의 짧은 스트레치를 말한다. 에피토프 태킹은 적절한 발현 벡터에서 단백질-암호 서열에 에피토프 태그의 서열을 포함시켜 이루어진다. 에피토프 태그가 붙은 단백질은 태그에 대해 생성된 매우 특이적인 항체를 이용하여 친화성 정제될 수 있다.

[0160] 본원에서 사용된 것으로서, 금속 결합 서열은 금속 이온, 금속 이온의 세트 또는 특정 금속 이온에 결합할 수 있는 단백질 또는 펩티드 서열을 말한다.

[0161] 본원에서 사용된 것으로서, 조합은 둘 또는 그 이상의 임의의 연합을 말한다.

[0162] 본원에서 사용된 것으로서, 조성물은 임의의 혼합물을 말한다. 그것은 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 임의의 그 조합일 수 있다.

[0163] 본원에서 사용된 것으로서, 유체는 유동할 수 있는 임의의 조성물을 말한다. 유체는 따라서 반고체, 페이스트, 용액, 수성 혼합물, 젤, 로션, 크림 및 다른 그러한 조성물의 형태인 조성물을 포괄한다.

[0164] 본원에서 사용된 것으로서, 세포 추출물은 용혈되거나 파괴된 세포로부터 만들어진 제제 또는 분획을 말한다.

[0165] 본원에서 사용된 것으로서, 제제가 단백질만의 또는 그 관련 기질, 결합 파트너 등과의 연합에 관련된 특이적 서열에 대한 고려없이 임의로 선택될 때 제제는 임의로 선택된다고 말한다. 임의 선택된 제제의 예는 화학적

라이브러리 또는 펩티드 조합 라이브러리 또는 유기체의 성장 배양액 또는 조절된 배지의 사용이다.

[0166] 본원에서 사용된 것으로서, 제제가 표적 부위의 서열 및/또는 제제의 작용과 관련된 그 형태를 고려하는 비-임의 기초로 선택되면 제제는 이성적으로 선택되거나 고안되는 것으로 말한다. 실시예에 개시된 대로, 서열 번호 1 또는 서열 번호 4를 갖는 당단백질에는 하이알우로니다제를 위한 제안된 결합 부위 및 (촉매) 부위가 있다. 제제는 이들 부위를 구성하는 펩티드 서열을 이용함으로써 이성적으로 선택되거나 이성적으로 고안될 수 있다. 예를 들어, 이성적으로 선택된 펩티드 제제는 그 아미노산 서열이 ATP 또는 칼모듈린 결합 부위 또는 도메인과 동일한 펩티드일 수 있다.

[0167] 올리고당류는 환원성 말단의 당이 실제 환원당이건 아니건 간에, 환원성 말단과 비환원성 말단을 갖는 것으로 생각된다. 허용된 명명법에 따라, 올리고당은 왼쪽의 비환원성 말단 및 오른쪽의 환원성 말단으로 묘사된다. 여기서 개시된 모든 올리고당은 비환원당의 명칭 또는 약자(예, Gal), 이어서 글리코시드 결합의 형태(.알파 또는 .베타), 고리 결합, 그 결합에 관련된 환원성 당의 고리 위치, 및 이어서 환원성 당의 명칭 또는 약자(예, GlcNAc)로 표시된다. 두 당 사이의 연결은 예를 들어 2,3,2.fw darw.3, 또는 (2,3).으로 표현될 수 있다. 각 당은 피라노즈이다.

[0168] 본원에서 사용된 것으로서, N-결합된 당 모이어티는 Asn 잔기의 아미드 질소를 통하여 sHASEGP에 부착된 올리고당을 말한다. N-결합된 올리고당은 몇 가지 주요 타입으로 나뉘며(올리고만노즈, 복합체, 하이브리드, 황화), 이들 모두는 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 서열(여기서 Xaa는 Pro가 아님)내에 속하는 Asn 잔기의 아미드 질소를 통하여 부착된 (Man) 3- GlcNAc-GlcNAc-코어를 갖는다. N-결합된 부위는 종종 서열 결정동안 "블랭크" 사이클의 출현에 의해 간접적으로 지정된다. 당화된 Asn을 Asp로 전환시키는 PNG아제 F에 의해 올리고당을 방출시킨 후 양성 확인이 이루어질 수 있다. PNG아제 F 방출 후, N-결합된 올리고당은 Bio-Gel P-6 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있으며, 올리고당 풀은 제조성 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC)에 노출된다 (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem.182, 1-8). 일부 올리고당 이성질체는 HPAEC를 이용하여 분리될 수 있다. 푸코스 잔기는 HPAEC 크로마토그램에서 용출 위치를 더 앞으로 이동시킬 것이며, 한편 추가의 시알산 잔기는 보유 시간을 증가시킬 것이다. 올리고당 구조가 공지된 당단백질 (예, 소 페투인, a-1 산 당단백질, 난백알부민, RNAse B, 트랜스페린)을 동시에 처리하면, 올리고당 피크의 지정을 촉진할 수 있다. 수집된 올리고당은 조성 분석 및 메틸화 결합 분석의 조합에 의해 특징을 규명하며 (Waegheet al., (1983) Carbohydr Res. 123,281-304.), 이때 아노머 형태는 NMR 분광광도법에 의해 지정된다 (Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230).

[0169] 다르게는, 올리고당은 형광 보조 탄수화물 전기영동(FACE)에 의해 확인할 수 있다 (Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281).

[0170] 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "시알산"은 9-탄소 카르복실화 당의 패밀리의 임의의 구성원을 말한다. 시알산 패밀리의 가장 흔한 구성원은 N-아세틸뉴라민산(2-케토-5-아세트아민도-3,5-디데옥시-D-글리세로-D-갈락토노누로피라노스-1-온산) (종종 Neu5Ac, NeuAc, 또는 NANA로 약칭됨)이다. 이 패밀리의 두번째 구성원은 N-글리콜일-뉴라미닌산(Neu5Gc 또는 NeuGc)이며 여기서 NeuAc의 N-아세틸기는 하이드록시화된다. 세번째 시알산 패밀리 구성원은 2-케토-3-데옥시-노누로손산(KDN)이다 (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:21811-21819). 또한 9-O-락틸-Neu5Ac 또는 9-O-아세틸-Neu5Ac, 9-데옥시-9-플루오로-Neu5Ac 및 9-아지도-9-데옥시-Neu5Ac와 같이 9-O-$C_1$-$C_6$ 아실-Neu5Ac와 같은 9-치환된 시알산 또한 포함된다. 시알산 패밀리의 리뷰를 위해서는 예를 들어, Varki (1992) Glycobiology 2:25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, N. Y. (1992))를 참고한다. 시알화 과정에서 시알산 화합물의 합성 및 사용은 1992년 10월 1일에 공개된 국제 출원 WO92/16640호에 개시된다.

[0171] 본원에서 사용된 것으로서, PNG아제는 플라보박테리움 마닌고셉툼 (*Flavobacterium maningoseptum*) 펩티드-N-글리코시다제 F와 같은 아스파라긴 펩티드 특이적 N-글리코시다제 F를 말한다. PNG아제 효소는 O-결합된 올리고당이 아닌 N-결합된 올리고당에 대한 그들의 특이성을 특징으로 한다. PNG아제 효능의 특성규명은 SDS PAGE 전기영동, 또는 형광 보조된 탄수화물 전기영동 둘다에 의해 이루어질 수 있다.

[0172] 본원에서 사용된 것으로서, 실질적으로 말단화된 시알화는 말단 당으로서 시알산 잔기로 끝나는 N-결합된 올리고당을 말한다. 말단 시알산은 뉴라미니다제로 처리한 후 유리된 탄수화물의 FACE 분석에 의해 확인될 수 있다.

[0173] 혈액중의 당단백질의 순환 수명은 N-결합된 탄수화물 기의 조성 및 구조에 크게 의존한다. 이 사실은 비경구로 투여될 치료적 당단백질과 직접 관련이 있다. 일반적으로, 당단백질의 최대 순환 반감기는 그것의 N-결합된 탄

수화물기가 서열 NeuAc-Gal-GlcNAc로 끝날 것을 요한다. 말단 시알산(NeuAc)이 없으면, 당단백질은 하부의 N-아세틸갈락토스아민(GalNAc) 또는 갈락토스(Gal) 잔기의 인식에 관련되는 기작에 의해 혈액으로부터 신속하게 제거된다 (Goochee et al. (1991) Biol/Technology 9: 1347-1355). 이러한 이유로, 치료적 당단백질의 N-결합된 탄수화물기상의 말단 시알산의 존재를 확실히 하는 것은 그들의 상업적 개발을 위해 중요한 고려사항이다.

[0174] 순환 당단백질은 말단 시알산 잔기를 제거할 수 있는 시알리다제 (또는 뉴라미니다제)에 노출된다. 일반적으로 시알산의 제거는 갈락토스 잔기를 노출시키며, 이들 잔기는 간세포의 갈락토스-특이적 수용체에 의해 인식되어 결합된다 (Ashwell and Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51 :531에 리뷰됨). 간은 또한 순환계로부터 당단백질의 제거를 매개하는 다른 당-특이적 수용체를 함유한다. 그러한 수용체의 특이성은 또한 N-아세틸글루코스아민, 만노스, 푸코스 및 포스포만노스를 포함한다. 간세포의 갈락토스 수용체에 의해 제거된 당단백질은 실질적인 분해를 일으키고 이어서 담즙으로 들어가며; 쿠퍼 세포의 만노스 수용체에 의해 제거된 당단백질은 소포체 시스템으로 들어간다 (Ashwell and Harford (1982) Ann. Rev. Biochem.에 리뷰됨).

[0175] 본원에서 사용된 것으로서, 중성 활성은 150 mM 미만의 염 및 50 mM 미만의 완충 강도의 조건하에서 5 내지 8 사이의 pH에서 생체외에서 글리코스아미노글리칸 기질에 대해 촉매 활성을 갖는 sHASEGP 당단백질을 말한다.

[0176] 본원에서 사용된 것으로서, 안정화된 용액은 실온에서 30일간 저장 후 그 초기 활성의 60% 이상을 보유하는 sHASEGP를 말한다.

[0177] 본원에서 사용된 것으로서, 달리 특정되지 않으면, 단위는 탁도 감소 유닛 (TRU)로 표현된다. 1 TRU는 하이알우론산의 산성화 용액의 탁도를 감소시키는 데 필요한 하이알우로니다제 활성의 양으로 정의되며 U.S.P./내셔널 포뮬러리(NF XIII) 유닛(NFU)에 등가이다. 여기서 개시된 ELISA-형 효소 분석은 U.S.P.를 통해 표준화된 하이알우로니다제 샘플의 표준 곡선 (예, USP 또는 WHO 표준)을 통해 TRU, NFU 및 U.S.P. 유닛에 관련될 수 있다. 따라서, ELISA-형 효소 분석에 의해 결정된 효소 활성은 실제로 상대적인 TRU이며, 이는 효소 활성이 탁도계 분석을 이용하여 실제로 측정되지 않기 때문이다 (Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172: 367).

[0178] 본원에서 사용된 것으로서, 효능은 탁도 감소 유닛 또는 상대적 탁도 감소 유닛에 기초하여 생체외에서 기질을 분해시키는데 필요한 sHASEGP 단백질의 양에 의해 정의된다.

[0179] 본원에서 사용된 것으로서, 비 활성은 단백질 mg 당 활성의 유닛을 말한다. sHASEGP 단백질의 양은 $M^{-1}cm^{-1}$의 단위로, 약 1.7의 몰 소멸 계수를 가정할 때 280 nm에서 sHASEGP 용액의 흡수에 의해 정의된다.

[0180] 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 생물물질, 생물공학 및 의약에서 주로 널리 이용되어 왔으며 이는 PEG가 생물융화성이고, 비독성이며, 비면역원성이고 수용성인 중합체이기 때문이다 (Zhao and Harris, ACS Symposium Series 680 : 458-72, 1997). 약물 전달 분야에서는, PEG 유도체는 면역원성, 단백질분해 및 신장 소거를 감소시키고 용해도를 증가시키기 위하여 단백질에 공유 결합되어 (즉, "PEG화") 널리 사용되어 왔다 (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16: 157-82, 1995). 유사하게, PEG는 저분자량의, 상대적으로 소수성인 약물에 부착되어 용해성을 증가시키고, 독성을 감소시키고 생체분포를 변화시켰다. 일반적으로, PEG화된 약물은 용액으로 주사된다.

[0181] 밀접하게 관련된 분야는, 분해성의 가용성 약물 담체의 고안에서 사용되는 동일한 화학의 다수가 또한 분해성 겔의 고안에서 이용될 수 있으므로, 약물 전달에 사용하기 위한 가교된 분해성 PEG 네트워크 또는 제제의 합성이다 (Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993). 거대 분자간 복합체는 두 상보성 중합체의 용액을 혼합함으로써 형성될 수 있음이 또한 알려져 있다. 그러한 복합체는 일반적으로 관련된 중합체간의 정전기적 상호작용 (다가음이온-다가양이온) 및/또는 수소 결합 (다가산-다가염기)에 의해, 및/또는 수성 주변에서 중합체간의 소수성 상호작용에 의해 안정화된다 (Krupers et al., Eur. Polym J. 32: 785-790, 1996). 예를 들어, 적절한 조건하에서 폴리아크릴산(PAAc) 및 폴리에틸렌 옥사이드(PEO)의 혼합 용액은 주로 수소 결합에 기초한 복합체의 형성을 야기한다. 생리학적 조건하에서 이들 복합체의 분해는 유리 약물(즉, 비-PEG화됨)의 전달을 위해 이용되었다. 또한, 상보성 중합체의 복합체는 단독중합체 및 공중합체 둘다로부터 형성되었다.

[0182] 한 태양에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 3 kD 내지 약 50 kD 범위, 그리고 바람직하게는 약 5 kD 내지 약 30 kD 범위의 분자량을 갖는다. 약물에의 PEG의 공유 결합 ("PEG화"로 알려짐)은 공지의 화학 합성 기법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 태양에서, 단백질의 PEG화는 NHS-활성화된 PEG를 적절한 반응 조건하에서 단백질과 반응시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0183] 많은 반응이 PEG화를 위해 개시되었지만, 가장 일반적으로 적용가능한 것들은 방향성을 부여하고, 온건한 반응 조건을 이용하며, 독성 촉매 또는 부산물을 제거하기 위해 심한 하부 가공을 필요로 하지 않는다. 예를 들어,

모노메톡시PEG(mPEG)는 단지 하나의 반응성 말단 하이드록실을 가지며, 따라서 그 사용은 생성된 PEG-단백질 생성물 혼합물의 이질성의 일부를 제한한다. 말단 메톡시기의 반대편의 중합체 말단에서 하이드록실기의 활성화는, 대개 친핵체 공격에 보다 민감한 유도체화 PEG를 만드는 것을 목표로 할 때, 효과적인 단백질 PEG화를 이루는 데 필요하다. 공격 친핵체는 대개 라이실 잔기의 입실론-아미노기이지만, 다른 아민은 또한 만일 국소적 조건이 우호적이면 반응할 수 있다 (예, 히스티딘의 N-말단 알파-아민 또는 고리 아민). 보다 지시된 부착은 단일 라이신 또는 시스테인을 함유한 단백질에서 가능하다. 후자는 티올-특이적 변형을 위해 PEG-말레이미드에 의해 표적화될 수 있다. 다르게는, PEG 히드라지드는 페리오데이트 산화된 sHASEGP와 반응하고 $NaCNBH_3$의 존재하에서 환원될 수 있다. 보다 구체적으로는, PEG화된 CMP 당은 적절한 글리코실-트랜스퍼라제의 존재하에서 sHASEGP와 반응할 수 있다. 한 기법은 많은 중합성 분자가 문제의 폴리펩티드에 연결되는 "PEG화" 기법이다. 이 기법을 이용할 경우, 면역 시스템은 항체의 형성을 일으키는 폴리펩티드의 표면상의 에피토프를 인식하는데 어려움을 가지며, 따라서 면역 반응을 감소시킨다. 특정 생리학적 효과를 주기 위해 사람 신체의 순환계내로 직접 도입된 폴리펩티드의 경우 (즉, 의약품), 일반적인 잠재적인 면역 반응은 IgG 및/또는 IgM 반응이며, 호흡기를 통하여 흡입되는 폴리펩티드 (즉, 산업적 폴리펩티드)는 잠재적으로 IgE 반응 (즉, 알러지 반응)을 일으킬 수 있다. 감소된 면역 반응을 설명하는 이론중 하나는 중합 분자가 항체 형성을 야기하는 면역 반응을 일으키는 폴리펩티드의 표면상의 에피토프를 숨긴다는 것이다. 다른 이론 또는 적어도 부분적인 인자는 접합체가 무거울 수록 면역 반응이 더 감소된다는 것이다.

[0184] 폴리펩티드에 결합된 중합성 분자는 폴리올 (즉, 폴리-OH), 폴리아민 (즉, 폴리-$NH_2$) 및 폴리카르복실산 (즉, 폴리-COOH)와 같은 천연 및 합성 단독중합체, 및 추가로 이종중합체, 즉 예를 들어 하이드록실기 및 아민기와 같은 상이한 결합기 하나 이상을 포함하는 중합체를 비롯한, 본 발명에 따라 정의된 분자량을 갖는 임의의 적합한 중합성 분자일 수 있다.

[0185] 적합한 중합성 분자의 예는 폴리프로필렌 글리콜(PEG), 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG) 및 폴리프로필렌 글리콜을 비롯한 폴리알킬렌 글리콜(PAG)과 같은 폴리알킬렌 옥사이드(PAO), PEG-글리시딜 에테르(Epox-PEG), PEG-옥시카르보닐이미다졸(CDI-PEG) 분지쇄 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알콜(PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리-D,L-아미노산, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 카르복시메틸-덱스트란을 비롯한 덱스트란, 헤파린, 상동성 알부민, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 에틸렐룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스 카르복시에틸셀룰로스 및 하이드록시프로필셀룰로스를 비롯한 셀룰로스, 키토산의 가수분해물, 하이드록시에틸-전분 및 하이드록시프로필-전분과 같은 전분, 글리코겐, 아가로즈 및 그 유도체, 구아 고무, 풀루란, 이눌린, 잔탄 고무, 카라기난, 펙틴, 알긴산 가수분해물 및 생물중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 중합성 분자를 포함한다.

[0186] 바람직한 중합성 분자는 효소의 표면상의 부착기에 공유 결합하기 위해 상대적으로 간단한 화학을 추가로 요하는 (m)폴리에틸렌 글리콜(mPEG)과 같은 비독성 중합성 분자이다.

[0187] PEG 및 특히 mPEG와 같은 폴리에틸렌 옥사이드와 같은 일반적으로 보여지는 폴리알킬렌 옥사이드(PAO)는, 이들 중합성 분자가 덱스트란, 풀루란 등과 같은 다당류에 비하여, 바람직하지 못한 가교가능한 반응성 기를 적게 가지므로 바람직한 중합성 분자이다.

[0188] **B. 조직 발현 프로파일 sHASEGP.**

[0189] 이전에는 고환 특이적으로 생각되었지만, 사람 sHASEGP는 RT-PCR과 같은 보다 민감한 기법을 이용할 경우 사람에서 다수의 조직에서 발현된다. sHASEGP 전사물은 골수(뇌), 미세혈관 내피, 전립선, 유방, 망막, 수집된 사람 멜라닌 세포, 태아 심장, 및 임신 자궁에서 발견된다. sHASEGP는 또한 생식세포 종양에서 발현된다. sHASEGP 전사물의 RT-PCR 계 검출은 일반적으로 고환외의 조직에서의 농도를 검출하는 데 필요하다.

[0190] **C. sHASEGP 효소 활성을 위한 분석**

[0191] 하이알우로니다제 활성을 위한 탁도계 미세적정 분석

[0192] 하이알우로니다제 활성은 산성화된 혈청 용액에서 변형된 탁도계 분석에 의해 검출될 수 있다. 필요한 시약은 다음과 같다:

| | | |
|---|---|---|
| 관주를 위한 UV-살균된 2X-탈이온수 또는 멸균수 | 브라운 | R5000-01 |
| 히루메드 의약 - 소듐 하이알우로네이트, 고분자량 HA | 젠자임 어드밴스드 바이오머티리얼즈 | 4876 |
| 하이알우로니다제 참고 표준 | USP | 31200 |
| 포타슘 아세테이트, 입자형, USP, ACS | JTBaker | 2914-01 |
| 빙초산, 99+ % | 시그마 | A-6283 |
| 염화인산 일염기 일수화물, USP 입자형 | 말린크로트 | 7774 |
| 염화인산 이염기 무수물, USP | 말린크로트 | 7771 |
| 염화나트륨, 결정, GR, ACS | EMScience | SX0420-5 |
| 젤라틴 가수분해물 효소적 | 시그마 | G-0262 |
| 말 혈청, 공여제 집단, 세포 배양물 시험됨, 하이브리도마 배양물 시험됨, USA 기원 | 시그마 | H-1270 |
| 사람 혈청 알부민 20% | 그리폴스 | |
| 염산, ACS 시약 | 시그마 | H-7020 |
| 칼슘 클로라이드, 디하이드레이트, 입자, USP, -FCC | JTBaker | 1336-01 |

[0193]

[0194] 하기 시약을 준비한다: 아세테이트 완충 용액 - 물 중의 14.0 g의 포타슘 아세테이트 및 25.0 mL의 빙초산을 1000 mL로 만든다. 포스페이트 완충 용액 - 물 중의 2.5 g의 염화인산 일염기, 1.0 g의 무수 염화인산 이염기, 및 8.2 g의 염화나트륨을 1000 mL로 만든다. 효소 희석 저장 용액 - 500 mL의 물과 500 mL의 포스페이트 완충 용액. 효소 희석 작업 용액 - 효소 희석 저장 용액 50 mL중의 33 mg의 가수분해된 젤라틴 - 사용 2시간내에 제조함. 샘플 안정화 완충 용액("SSB" 용액) - 50 mL의 효소 희석 작업 용액중의 125 ㎕의 20% 사람 혈청 알부민 용액 및 50 ㎕의 1 M 칼슘 클로라이드 용액, 완전히 혼합한다. 혈청 저장 용액 - 말 혈청 1 부피를 9 부피의 아세테이트 완충 용액으로 희석한다. 4 N 염산으로 pH를 3.1로 조절하고 실온에서 18 내지 24시간 동안 용액을 정치시킨다. 용액을 4℃에서 저장하고, 30일이내에 사용한다. 혈청 작업 용액 - 30 mL의 아세테이트 완충 용액중의 10 mL의 혈청 저장 용액, 실온으로 조절한다. 하이알우론산 저장 용액 - 물중의 5.0 mg/mL 농도의 소듐 하이알우론산. 하이알우론산 작업 용액 - 4.25 mL의 포스페이트 완충 용액중의 0.75 mL의 하이알우론산 저장 용액. 표준 저장 용액 - 물 중의 1000 유닛/mL 농도의 USP 참고 표준 하이알우로니다제의 한 용기, 50 ㎕ 분취액으로 분취하고, -20℃에서 저장함. 표준 작업 용액 - 960 ㎕의 차가운 효소 희석 작업 용액중의 40 ㎕의 표준 저장 용액으로 40 유닛/ml 농도를 갖는 용액을 얻으며, 분석에 사용하기 직전에 제조된다.

[0195] 모든 효소 샘플은 하기의 안내에 따라 "저 단백질 결합" 96-웰 플레이트에서 희석된다:

[0196] a) 이 분석의 최대 민감도 범위는 10-30 유닛/mL 사이이다. 범위내의 결과를 얻기 위해 분석이 반복되는 횟수를 최소화하기 위하여, 먼저 샘플을 위한 전체 유닛/mL의 대략적인 수를 결정하고, 이어서 최종 농도가 약 20 유닛/mL이도록 (전체 수) 희석을 선택한다.

[0197] b) 분석을 실시하는 데 필요한 최소 샘플 부피는 다음과 같다: FPLC 분획 = 50 ㎕, 조직 배양 상등액 = 1mL, 정제/농축/최종 단계 재료 = 10 ㎕.

[0198] c) 연속 희석을 갖는 샘플의 경우, "SSB" 용액 360 ㎕ 및 샘플 40 ㎕를 각 웰에 피펫팅함으로써 "저 단백질 결합" 96-웰 플레이트에서의 1:10 희석을 세벌로 만든다.

[0199] USP 표준의 제조를 위하여, "저 단백질 결합" 96-웰 플레이트에서 USP 표준 곡선을 다음과 같이 제조한다:

| USP 표준 곡선: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 웰: | 표준: | 효소 희석 용액 (㎕): | 표준 작업 용액 (㎕): | 최종 농도 (Units/mL): |
| 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 |

[0200]

[0201] 컬럼 1-3의 하이알우론산 대조군의 제조를 위해, "평면 바닥" 96-웰 플레이트에서 H.A. 대조군을 다음과 같이

제조한다:

[0202]

| | | H.A. 대조군 | |
|---|---|---|---|
| 웰 | 대조군 | 하이알우론산 작업 용액 (㎕) | 효소 희석 작업 용액 (㎕) |
| H1-H3 | Co01 | 0 | 60 |

[0203] 반응 플레이트: 웰 당 30 ㎕의 하이알우론산 작업 용액을 50 ㎕ 8-채널 전달 피펫을 이용하여 "평면 바닥" 96-웰 미세적정 플레이트내로 피펫팅하고 웰 H1-H3을 비워둔다. 60 ㎕/웰의 효소 희석 작업 용액을 HA 대조군으로서 동일 플레이트의 웰 H1-H3내로 피펫팅한다.

[0204] 혈청 작업 용액: 40 mL의 혈청 작업 용액을 전달 용기 내로 분배하고 열 블록으로 보낸다.

[0205] 예비가온 단계: 일단 두 플레이트가 준비되면, 희석 샘플, 표준, 대조군을 함유한 저 단백질 결합 96-웰 플레이트 및 하이알우론산 작업 용액을 함유한 평면 바닥 96-웰 플레이트를 열 블록에 놓고 37℃에서 5분동안 가온시킨다.

[0206] 반응은 효소를 기질에 첨가하여 시작된다: 5-50 ㎕ 8-채널 피펫을 이용하여 96-웰 평면 바닥 플레이트(기질 함유)의 컬럼 #1의 모든 웰내로 효소 플레이트로부터의 30 ㎕를 첨가한다. 효소/기질 반응 혼합물을, 완전한 샘플 혼합을 보장하기 위하여 처음 15초동안 이동시키면서 위 아래로 용액을 당기면서 5회 빨아들인다. 효소와 기질을 혼합한 후, 팁을 버리고 다음 컬럼을 위해서는 이동 피펫기에 새로운 팁 세트를 이용한다. 타이머를 다시시작하고, 시간 (t)=0:30에서, 이 과정을 컬럼 2를 위해 반복한다. 다음 30초 간격 (t)=1:00에서, 컬럼 3을 위해 이 과정을 반복한다. 이 과정은 모든 웰이 효소와 기질을 함유할 때까지 매 30초마다 플레이트를 왼쪽에서 오른쪽으로 가로질러 이동하면서 반복된다.

[0207] 반응의 정지: 타이머가 6분 (t) = 6:00에 도달할 때, 240 ㎕의 혈청 작업 용액을 50-300 ㎕ 8-채널 이동 피펫을 이용하여, 이웃한 50 mL 시약 저장기로부터 96-웰 평면 바닥 플레이트의 컬럼 1내로, 각 웰로 피펫팅한다. 혼합물을 완전한 혼합을 위해 처음 10초동안 (이동 피펫터를 이용하여 용액을 상하로 당기면서) 3회 빨아들인다. 상기 과정을 컬럼 1 에서 12까지 진행하면서 매 30초마다 반복한다. 마지막 컬럼(컬럼 12)가 완결되면, 반응 플레이트를 열 블록으로부터 제거하고 플레이트를 640 nM의 플레이트 판독기의 판독 트레이에 놓는다. 선형 곡선 피트가 시험 샘플의 외삽을 허용하는 표준 곡선으로부터 생성된다.

[0208] 하이알우로니다제<u>를 위한 다른 분석</u>

[0209] <u>비오틴화된 하이알우로난 미세적정 분석</u>

[0210] 하이알우로난의 글루쿠론산 잔기상의 자유 카르복실기는 비오틴-히드라지드(피어스), 설포 NHS(피어스) 및 1-에틸 디메틸아미노프로필-카르보디이미드(시그마)를 이용하여 1 단계 반응으로 비오틴화된다. 이 비오틴화된 HA 기질은 두번째 반응에서 96웰 미세적정 플레이트에 공유 결합된다. 효소 반응이 완결되면, 잔여 기질을 표준 ELISA 플레이트 판독기로 판독할 수 있는 아비딘-퍼옥시다제 반응으로 검출한다. 기질이 미세적정 플레이트에 공유 결합되므로, 비오틴화된 기질의 pH-의존성 치환과 같은 인위적 일은 일어나지 않는다. 만감성은 10% 미만의 분석간 편차로 배양 세포 및 생물 샘플로부터 하이알우로니다제 활성의 신속한 측정을 허용한다.

[0211] 하이알우로니다제의 비 활성은 탁도 감소 유닛(TRU)로 표현된다. 1 TRU는 하이알우론산의 산성화 용액의 탁도를 감소시키기 위해 필요한 하이알우로니다제 활성의 양으로 정의되며 U.S.P/내셔널 포뮬라리(NF XIII) 유닛(NFU)에 해당한다. 정제를 위해 이용되는 ELISA-형 효소 분석은 U.S.P.를 통해 표준화된 하이알우로니다제 샘플의 표준 곡선(예, USP)을 통해 TRU, NFU 및 U.S.P. 유닛에 관련될 수 있다. 따라서, ELISA-형 효소 분석에 의해 결정된 효소 활성은 실제로 상대적인 TRU이며, 이는 효소 활성이 탁도계 분석을 이용하여 실제로 측정되지 않기 때문이다 (Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172: 367).

[0212] 많은 하이알우로니다제 분석은 새로운 환원성 N-아세틸아미노기의 생성( (Bonner and Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752,1966), 또는 점도의 손실(De Salegui et al., Arch. Biochem. Biophys. 121: 548-554,1967) 또는 탁도(Dorfman and Ott, J. Biol. Chem. 172: 367,1948)의 측정에 기초하였다. 정제된 기질을 이용하면, 모든 이들 방법은 엔도글루코스아미드 활성의 존재 또는 부재의 결정에 충분하다.

[0213] 실질적으로 정제된 글리코스아미노글리칸 기질은 또한 젤 이동 분석에 사용될 수 있다. 글리코스아미노글리칸은 젤 내에서 기질 이동성의 변화를 야기하는, 엔도글루코시다제 활성을 시험하기 위해 재조합 sHASEGP와

혼합된다. 콘드로이친-4 및 6 설페이트, 더마탄 설페이트, 헤파란-설페이트는 시그마 케미컬로부터 얻을 수 있다. 사람 탯줄 하이알우로난은 ICN으로부터 얻을 수 있다. 각 시험 기질은 pH 3.5-7.5의 완충 범위에서 0.1 mg/ml로 희석된다. 정제된 sHASEGP 또는 sHASEGP 발현 세포로부터의 조절된 배지의 10 ㎕ 샘플을 원하는 완충액 중의 시험 기질 90 ㎕와 혼합하고 37℃에서 3시간 동안 항온처리한다. 항온처리 후, 샘플을 샘플 완충액(트리스 EDTA pH 8.0, 브로모페놀 블루 및 글리세롤)으로 중화시키고 이어서 전기영동시킨다. 글리코스아미노글리칸은 3% 빙초산중의 0.5% 알시안 블루에서 젤을 밤새 염색하고 이어서 7% 빙초산으로 탈염색시켜 검출한다. 분해는 효소의 존재 및 부재하에서 기질 이동성을 비교하여 결정된다.

[0214] 하이알우로니다제 활성은 또한 기질 젤 지모그래피에 의해 검출될 수 있다 (Guentenhoner et al., 1992, Matrix 388-396). 이 분석에서, 샘플은 하이알우론산을 함유한 SDS-PAGE 젤에 가해지고 샘플내의 단백질은 전기영동에 의해 분리된다. 이어서 젤을 효소 분석 완충액에서 항온처리하고 이어서 염색하여 젤내의 하이알우론산을 검출한다. 하이알우로니다제 활성은 기질 젤에서 투명한 구역으로 가시화된다.

[0215] **D. sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 확인 및 분리**

[0216] sHASEGP 폴리펩티드 유전자 및/또는 그 도메인은 DNA 분리를 위한 공지 방법에 의해 얻을 수 있다. 원하는 유전자를 암호하는 핵산의 확인을 위한 임의의 공지 방법을 이용할 수 있다. 당업계에서 이용가능한 임의 방법은 sHASEGP 폴리펩티드를 암호하는 전체-길이(즉, 전체 암호 영역을 포함) cDNA 또는 게놈 DNA 클론을 얻기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 정상 조직에서 발현되는 서열, 예를 들어, sHASEGP 폴리펩티드(서열 번호 1 및 2)를 암호하는 핵산을 게놈 또는 cDNA 라이브러리에서 증폭시키기 위해 이용될 수 있다. 확인된 서열의 3' 및 5' 말단의 서열에 하이브리드하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 프라이머로 이용하여 적절한 공급원(예, 고환, 전립선, 유방)으로부터의 핵산 샘플(RNA 또는 DNA, 일반적으로 cDNA 라이브러리)로부터 PCR에 의해 서열을 증폭시킬 수 있다.

[0217] PCR은 예를 들어, 퍼킨-엘머 세터스 열 사이클러 및 Taq 폴리머라제(진 앰프)를 사용하여 실시될 수 있다. 증폭될 DNA는 임의의 진핵 종으로부터의 mRNA 또는 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다. PCR 반응에 사용하기 위해, 몇 가지 상이한 축퇴 프라이머를 합성하기 위해 선택할 수 있다.

[0218] 공지의 뉴클레오티드 서열과 분리될 핵산 상동체간의 더 크거나 작은 뉴클레오티드 서열 유사성 정도를 허용함으로써 핵산 상동체를 증폭시키기 위해(예, 사람외의 종으로부터의 sHASEGP 폴리펩티드 서열을 얻기 위해 또는 sHASEGP 폴리펩티드에의 상동성을 갖는 사람 서열을 얻기 위해), PCR 반응을 프라임하는 데 이용되는 하이브리드화 조건의 엄격도를 다양하게 할 수 있다. 종간 하이브리드화의 경우, 낮은 엄격도 내지 중간 엄격도 조건을 이용한다. 동종 하이브리드화의 경우, 중간 엄격도 내지 높은 엄격도 조건을 이용한다. 상기 조건은 실험적으로 결정될 수 있다.

[0219] 확인된 sHASEGP 폴리펩티드 서열의 일부 또는 전부를 암호하는 핵산 또는 sHASEGP 폴리펩티드 상동체의 전부 또는 일부를 암호하는 핵산의 성공적인 증폭 후, 그 분절은 분자적으로 클론되고 서열결정되고, 완전한 cDNA 또는 게놈 클론을 분리하기 위한 프로브로서 이용될 수 있다. 다시, 이것은 유전자의 완전한 뉴클레오티드 서열의 결정, 그 발현의 분석, 및 기능적 분석을 위한 그 단백질 생성물의 생산을 허용한다. 일단 뉴클레오티드 서열이 결정되면, sHASEGP 폴리펩티드 유전자 단백질 생성물을 암호하는 개방 판독 프레임을, 개방 판독 프레임 결정을 위해 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 뉴클레오티드 서열 분석을 위한 공지의 컴퓨터 프로그램을 이용하여, 결정할 수 있다. 일단 개방 판독 프레임이 정의되면, 개방 판독 프레임에 의해 암호되는 단백질의 아미노산 서열을 결정하는 것은 일상적이다. 이러한 방식으로, 전체 sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 sHASEGP 폴리펩티드 단백질 및 유사체의 아미노산 서열을 확인할 수 있다.

[0220] 임의의 진핵 세포는 sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 분자 클로닝을 위한 핵산 공급원으로서 잠재적으로 작용할 수 있다. 핵산은 척추동물, 포유류, 사람, 돼지, 소, 고양이, 조류, 말, 개, 및 추가의 영장류 공급원, 곤충, 식물 및 다른 유기체로부터 분리될 수 있다. DNA는 클론된 DNA(예, DNA "라이브러리")로부터 공지된 표준 과정에 의해, 화학 합성에 의해, cDNA 클로닝에 의해, 또는 원하는 세포로부터 정제된 게놈 DNA 또는 그 단편의 클로닝에 의해 얻어질 수 있다 (예, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. Ed., 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U. K. Vol. 1,11 참고). 게놈 DNA에서 유래된 클론은 암호 영역에 더하여 조절 및 인트론 DNA를 함유할 수 있으며; cDNA에서 유래된 클론은 단지 엑손 서열만을 함유할 것이다. 임의의 공급원의 경우, 유전자는 그 증식에 적합한 벡터내로 클론된다.

[0221] 게놈 DNA로부터의 유전자의 분자 클로닝에서, DNA 단편이 생성되며, 그 일부는 원하는 유전자를 암호할 것이다.

[0222] 상기 DNA는 다양한 제한 효소를 사용하여 특정 부위에서 절단될 수 있다.

[0223] 다르게는, DNA의 단편화를 위해 망간의 존재하에서 DNA아제를 이용하거나, 또는 DNA는 예를 들어, 초음파처리에 의해 물리적으로 전단될 수 있다. 이어서 선형 DNA 단편은 아가로즈 및 폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 컬럼 크로마토그래피를 포함하며 이에 한정되지 않는 표준 기법에 의해 크기에 따라 분리될 수 있다.

[0224] 일단 DNA 단편이 생성되면, 원하는 유전자를 함유하는 특이적 DNA 단편의 확인은 많은 방식으로 이루어질 수 있다.

[0225] 예를 들어, 정제되고 표지될 (임의의 종의) sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 일부(예, 전술한 대로 얻어진 PCR 증폭 생성물 또는 공지의 뉴클레오티드 서열의 일부의 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드) 또는 그 특이적 RNA, 또는 그 단편, 및 생성된 DNA 단편은 표지된 프로브에 대한 핵산 하이브리드화에 의해 스크린될 수 있다 (Benton and Davis, Science 196: 180 (1977); Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 3961 (1975)). 프로브에 상당한 상동성을 갖는 이들 DNA 단편은 하이브리드할 것이다. 제한 효소 분해 및, 만일 이용 가능하다면 공지의 제한 효소 지도에 따라 예상되는 것들과 단편 크기를 비교함으로써, 또는 DNA 서열 분석 및 sHASEGP 폴리펩티드의 공지 뉴클레오티드 서열에의 비교에 의해, 적절한 단편을 확인하는 것이 가능하다. 추가의 선별은 유전자의 특성을 기초로 실시될 수 있다. 다르게는, 유전자의 존재는 그 발현 생성물의 물리적, 화학적, 또는 면역학적 특성에 기초한 분석에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 적절한 mRNA를 하이브리드-선별하는 cDNA 클론 또는 DNA 클론은 예를 들어, 유사하거나 동일한 전기영동 이동, 등전점 초점 행동, 단백질 분해 지도, 항원성 특성, 하이알우로니다제 활성을 갖는 단백질을 생산하는 것을 선택할 수 있다. 항- sHASEGP 폴리펩티드 항체가 이용가능하다면, ELISA(효소-결합된 면역흡착 분석)-타입 과정에서, 추정되는 sHASEGP 폴리펩티드 합성 클론에 표지된 항체를 결합시켜 단백질을 확인할 수 있다.

[0226] sHASEGP 폴리펩티드 게놈 DNA를 분리하기 위한 대안은 공지 서열로부터 유전자 서열을 화학적으로 합성하거나 sHASEGP 폴리펩티드를 암호하는 mRNA에 대한 cDNA를 만드는 것을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0227] 예를 들어, sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 cDNA 클로닝을 위한 RNA는 단백질 발현 세포로부터 분리될 수 있다. 이어서 확인되고 분리된 핵산을 적절한 클로닝 벡터내로 삽입할 수 있다. 공지된 많은 수의 벡터-숙주 시스템을 이용할 수 있다. 가능한 벡터는 플라스미드 또는 변형 바이러스를 포함하며 이에 한정되지 않으나, 벡터 시스템은 이용되는 숙주 세포와 융화성이어야 한다. 그러한 벡터는 람다 유도체와 같은 박테리오파아지, 또는 pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 블루스크립트 벡터(스트라타진, 캘리포니아주 라 졸라 소재)와 같은 플라스미드를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 클로닝 벡터내로의 삽입은 예를 들어, DNA 단편을 상보적인 코헤시브(cohesive) 말단을 갖는 클로닝 벡터내로 연결시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0228] DNA를 단편화시키기 위해 이용되는 상보성 제한 부위가 클로닝 벡터에 존재하지 않으면, DNA 분자의 말단을 효소적으로 변형시킬 수 있다. 다르게는, 원하는 임의 부위는 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단상에 연결시킴으로써 생산될 수 있으며; 이들 연결된 링커는 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열을 암호하는 특이적인 화학 합성 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다른 방법에서, 절단된 벡터 및 sHASEGP 폴리펩티드 유전자는 단독중합성 테일에 의해 변형될 수 있다.

[0229] 재조합 분자는 형질전환, 형질감염, 감염, 전기천공, 칼슘 침전 및 다른 방법을 통해 숙주 세포내로 도입되어 유전자 서열의 많은 카피가 생성될 수 있다.

[0230] 특이적 구체예에서, 분리된 sHASEGP 폴리펩티드 유전자, cDNA, 또는 합성 DNA 서열을 통합하는 재조합 DNA 분자로 숙주 세포를 형질전환시키면 다수의 유전자 카피의 생성이 가능하다.

[0231] 따라서, 형질전환체를 성장시키고, 형질전환체로부터 재조합 DNA 분자를 분리하고, 필요하면 분리된 재조합 DNA로부터 삽입된 유전자를 구함으로서 유전자를 다량으로 얻을 수 있다.

[0232] **E. sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 하이알우로니다제 도메인을 암호하는 핵산**을 함유하는 벡터, 플라스미드 및 세포, 및 sHASEGP 폴리펩티드 벡터의 발현 및 세포

[0233] sHASEGP 폴리펩티드 하나 이상의 재조합 발현의 경우, sHASEGP 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 함유하는 핵산을 적절한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질 암호 서열의 전사 및 번역을 위해 필요한 요소를 함유한 벡터내로 삽입할 수 있다. 필요한 전사 및 번역 시그널은 또한 sHASEGP 유전자를 위한 천연

프로모터 및/또는 그들의 인접 영역에 의해 공급될 수 있다.

[0234] 가용성의 중성 활성 sHASEGP 를 생산할 수 있는 발현 시스템내로 도입될 수 있는 sHASEGP 암호 핵산을 함유하는 벡터 또한 제공된다.

[0235] 벡터를 함유한 세포 또한 제공된다. 세포는 진핵 및 원핵 세포를 포함하며, 그안에서 사용하기에 적합한 벡터를 포함한다.

[0236] 벡터를 함유한, 디하이드로폴레이트 리덕타제 결핍 중국 햄스터 난소 세포(DG44)를 비롯한 진핵 세포가 제공된다. 적합한 세포는 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포를 포함한다. 세포는 (a) 암호된 sHASEGP 폴리펩티드 또는 sHASEGP 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인이 세포에 의해 발현되는 조건하에서 전술한 세포를 성장시키고, 이어서 (b) 발현된 하이알우로니다제 도메인 단백질을 회수함에 의해 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 하이알우로니다제 도메인을 생산하기 위해 이용된다. 예시된 구체예에서는, 하이알우로니다제 도메인이 배지내로 분비된다.

[0237] 한 구체예에서, 벡터는 하이알우로니다제 활성을 가지며 sHASEGP 단백질의 하이알우로니다제 도메인 전부 또는 일부, 또는 그 카피 다수를 함유하는 폴리펩티드를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하이알우로니다제 도메인 및 최대 전체-길이 sHASEGP 단백질까지, sHASEGP 단백질의 추가 부분 및 그 다수 카피를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 상기 벡터는 세포에서 sHASEGP 단백질 또는 그 하이알우로니다제 도메인의 발현을 위해 선택되거나 또는 sHASEGP 단백질이 분비 단백질로 발현되도록 선택될 수 있다. 다르게는, 벡터는 암호된 단백질의 분비에 필요한 시그널을 포함할 수 있다. 하이알우로니다제 도메인이 발현될 때 상기 핵산은 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*) 접합 인자 시그널 서열 또는 그 일부와 같은 분비 시그널을 암호하는 핵산 또는 천연 시그널 서열에 연결된다.

[0238] 가용성의 중성 활성 sHASEGP 를 생성하기 위하여, N-결합된 당화를 도입할 수 있는 세포가 필요하다. 바람직한 구체예에서, DG44와 같은 디하이드로폴레이트 리덕타제가 결핍된 포유류 중국 햄스터 난소 세포는 CMV와 같은 강한 포유류 프로모터, 내부 리보솜 진입 부위가 이어지는 sHASEGP 암호 핵산, 마우스 디하이드로폴레이트 리덕타제 유전자 및 SV40 폴리아데닐화 서열을 암호하는 플라스미드로 전기천공된다. 이어서 그러한 세포는 하이포잔틴 및 티미딘의 부재하에서 화학적으로 정의된 배지에서 배양되고 이어서 메토트렉세이트의 농도를 증가시키면서 추가의 유전자 증폭이 이루어진다.

[0239] 다양한 숙주-벡터 시스템을 이용하여 단백질 암호 서열을 발현시킬 수 있다. 이들은 바이러스(예, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)로 감염된 포유류 세포 시스템; 바이러스(예, 바큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유한 효모와 같은 미생물; 또는 박테리오파아지, DNA, 플라스미드 DNA, 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 박테리아를 포함한다. 벡터의 발현 요소는 그들의 강도 및 특이성에서 다양하다. 이용되는 숙주-벡터 시스템에 따라, 많은 적절한 전사 및 번역 요소중 임의의 하나를 이용할 수 있다. sHASEGP DNA의 박테리아 발현은 촉매 활성 sHASEGP 자체를 야기하지 않지만, 적절한 당화 장치와 결합되면 그렇게 인공적으로 당화될 수 있다.

[0240] 벡터내로 핵산 단편을 삽입하기 위한 공지의 방법을 이용하여 적절한 전사/번역 조절 시그널 및 단백질 암호 서열을 함유한 키메라 유전자를 함유한 발현 벡터를 구성할 수 있다. 이들 방법은 생체외 재조합 DNA와 합성 기법 및 생체내 재조합체(유전적 재조합)를 포함할 수 있다. sHASEGP 폴리펩티드, 또는 그 도메인, 유도체, 단편 또는 상동체를 암호하는 핵산 서열의 발현은 두번째 핵산 서열에 의해 조절될 수 있어, 유전자 또는 그 단편은 재조합 DNA 분자로 형질전환된 숙주에서 발현된다. 예를 들어, 단백질의 발현은 공지된 임의의 프로모터/인핸서에 의해 조절될 수 있다. 특정 구체예에서, 프로모터는 sHASEGP 폴리펩티드를 위한 유전자에 천연이 아니다. 이용될 수 있는 프로모터는 하기를 포함하며 이에 제한되지 않는다: SV40 초기 프로모터(Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310(1981)), 라우스 사코마 바이러스의 3' 긴 말단 반복체에 함유된 프로모터(Yamamoto et al.,Cell 22 : 787-797 (1980)), 허피스 티미딘 키나제 프로모터 (Wagner et al. Proc.Natl. Acad. Sci. USA78 : 1441-1445(1981)), 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열 (Brinster et al., Nature 296: 39-42(1982))를 포함하며 이에 한정되지 않으며; B-락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 1978)) 또는 TAC 프로모터(Deboer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA80: 21-25(1983))와 같은 원핵 발현 벡터; 또한 "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" : in Scientific American 242: 79-94(1980))를 참고하며; 오팔린 신세타제 프로모터(Herrar-Estrella et al., Nature 303: 209-213(1984)) 또는 컬리플라워 모자이크 바이러스 35S RNA 프로모터(Garder et al., Nucleic Acids RES. 9: 2871 (1981)) 및 광합성 효소 리불로스 비스포스페이트 카르복실라제의 프로모터(Herrera- Estrella et AL., Nature 310: 115-

120(1984))를 함유하는 식물 발현 벡터; Gal4 프로모터와 같은 효모 및 다른 진균류로부터의 프로모터 요소, 알콜 디하이드로게나제 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 프로모터, 알카라인 포스파타제 프로모터, 및 조직 특이성을 나타내며 형질전환 동물에서 이용되어 온 하기의 동물 전사 조절 영역:췌장 샘꽈리 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역(Swift Et Al., Cell 38: 639-646(1984); Ornitz Et Al., Cold Spring HarborSymp. Quant.Biol. 50: 399-409(1986); Macdonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역 (Hanahan et AL., Nature 315 : 115 - 122(1985)), 림프 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역 (Grosschedl et AL., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538(1985); Alexander et AL., Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), 고환, 유방, 림프 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유선 종양 바이러스 조절 영역 (Leder et AL., CELL 45: 485-495(1986)), 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역 (PINCKERT et AL., Genes and Devel. 1: 268-276(1987)), 간에서 활성인 알파-페토 단백질 유전자 조절 영역 (Krumlauf et AL., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648(1985); Hammer et AL., Science 235: 53-58 1987)), 간에서 활성인 알파-1 안티트립신 유전자 조절 영역 (Kelsey et al., Genes And Devel. 1: 161-171 (1987)), 골수 세포에서 활성인 베타 글로빈 유전자 조절 영역 (Mogram et al., Nature 315: 338-340 (1985); Kollias et AL., CELL 46: 89-94 (1986)), 뇌의 핍지교세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역 (Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)), 골격 근육에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역 (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)), 및 시상하부의 생식샘 자극 세포에서 활성인 생식샘자극 방출 호르몬 유전자 조절 영역 (Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)).

[0241] 구체적인 구체예에서, sHASEGP 폴리펩티드, 또는 그 도메인, 단편, 유도체 또는 상동체를 암호하는 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터, 하나 이상의 복제 기원, 및 선택적으로 하나 이상의 선택성 마커(예, 항생제 내성 유전자)를 함유하는 벡터가 이용된다.

[0242] 구체적인 개시 시그널은 또한 sHASEGP 서열의 효율적인 번역을 위해 필요할 수 있다. 이들 시그널은 ATG 개시 코돈 및 이웃한 서열을 포함한다. sHASEGP, 그 개시 코돈 및 상부 서열이 적절한 발현 벡터내로 삽입되는 경우, 추가의 번역 조절 시그널이 필요하지 않을 수도 있다. 하지만, 단지 암호 서열 또는 그 일부만이 삽입되는 경우, ATG 개시 코돈을 비롯한 외인성 전사 조절 시그널이 제공되어야 한다. 더욱이, 개시 코돈은 전체 삽입체의 전사를 확실히 하기 위해 정확한 판독 프레임으로 존재해야 한다. 외인성 전사 요소 및 개시 코돈은 천연 및 합성의 다양한 기원일 수 있다. 발현의 효율은 사용되는 세포 시스템에 적합한 인핸서의 포함에 의해 증가될 수 있다 (Scharf D et al (1994) Results Probl Cell Differ 20: 125-62; Bittner et al(1987) Methods in Enzymol 153: 516-544).

[0243] 또한, 숙주 세포 균주는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 원하는 방식으로 발현 단백질을 가공하는 능력에 대해 선택될 수 있다. 폴리펩티드의 그러한 변형은 아세틸화, 카르복시화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 단백질의 "프리프로" 형태를 절단하는 번역후 가공은 또한 정확한 삽입, 접힘 및/또는 기능에 중요할 수 있다. CHO (DG44, DXB 11 CHO- K1), HeLa, MDCK, 293, WI38 등과 같은 상이한 숙주 세포는 그러한 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 장치 및 특징적인 기작을 가지며, 도입된 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하도록 선택될 수 있다.

[0244] 재조합 단백질의 장기적인 고수율 생산을 위해, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, sHASEGP를 안정하게 발현하는 세포주는 바이러스 복제 기원 또는 내인성 발현 요소 및 선택성 마커 유전자를 함유하는 발현 벡터를 이용하여 형질전환될 수 있다. 벡터의 도입 후, 세포를 선택성 배지로 옮기기 전에 농축 배지에서 1-2일동안 성장시킬 수 있다. 선택성 마커의 목적은 선별에 대한 내성을 부여하는 것이며, 그 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 성장 및 회수를 허용한다. 안정하게 형질전환된 세포의 내성 덩어리는 세포 타입에 적합한 조직 배양 기법을 이용하여 증식될 수 있다.

[0245] 형질전환된 세포주를 회수하기 위하여 임의의 수의 선별 시스템을 이용할 수 있다. 이들은 각각 TK- 또는 ATRP- 세포에서 이용될 수 있는, 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler M et al (1977) Cell 11: 223-32) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy I et al (1980) Cell 22: 817-23) 유전자를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 또한, 항대사산물, 항생제 또는 제초제 내성을 선별의 기초로 이용할 수 있다: 예를 들어, 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 DHFR (Wigler M et al (1980) Proc Natl Acad Sci 77: 3567-70); 아미노글리코시드 네오마이신 및 G-418 에 대한 내성을 부여하는 npt (Colbere-Garapin F et al (1981) J Mol Biol 150: 1-14) 및 각각 클로르설푸론 및 포스피노트리신 아세틸트랜스퍼라제에 대한 내성을 부여하는 als 또는 pat (Murry, 상기). 추가의 선택성 유전자는 예를 들어 트립토판 대신 인돌을 세포가 이용하게 하는 trpB, 또는 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 이용하도록 하는 hisD (Hartman S C and R C Mulligan (1988) Proc Natl Acad

Sci85 :8047-51)가 개시되었다. 최근에는, 가시적 마커의 이용이 인기를 얻었으며, 그러한 마커로는 형질전환체의 확인뿐만 아니라 특이적 벡터 시스템에 기인하는 일시적 또는 안정한 단백질 발현의 양을 정량하기 위해 널리 이용되는, 안토시아닌, 베타 글루쿠로니다제 및 그 기질, GUS, 및 루시퍼라제 및 그 기질, 루시페린과 같은 마커가 있다 (Rhodes C A et al (1995) Methods Mol Biol 55:121-131).

[0246] 폴리뉴클레오티드 서열을 함유한 형질전환체의 확인

[0247] 마커 유전자 발현의 존재/부재가 대상 유전자 또한 존재함을 제안할지라도, 활성 sHASEGP의 존재 및 발현이 확인되어야 한다. 예를 들어, 만일 sHASEGP가 마커 유전자 서열내로 삽입되면, sHASEGP를 함유한 재조합 세포는 마커 유전자 기능의 부재에 의해 확인될 수 있다. 다르게는, 마커 유전자는 단일 프로모터의 조절하에서 sHASEGP 서열과 탠덤하게 위치할 수 있다. 유도 또는 선별에 대한 반응으로 마커 유전자의 발현은 대개 탠덤 sHASEGP의 발현을 나타낸다. 적절하게 당화된 중성 활성 sHASEGP의 검출은 적절한 조건하에서 sHASEGP 효소 활성을 위한 조절된 배지를 시험하는 방식으로 결정될 수 있다.

[0248] sHASEGP의 정제

[0249] sHASEGP 뉴클레오티드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 세포 배양물로부터 암호된 단백질의 발현 및 회수에 적합한 조건하에서 배양될 수 있다. 재조합 세포에 의해 생산된 단백질은 바람직하게는 분비되지만 사용된 서열 및/또는 벡터에 따라 세포내에 함유될 수도 있다. 당업자가 이해하는 것처럼, sHASEGP를 함유하는 발현 벡터는 원핵 또는 진핵 세포막을 통해 sHASEGP가 직접 분비되도록 촉진하는 시그널 서열을 갖도록 고안될 수 있다. 다른 재조합 구성체는 가용성 단백질의 정제를 촉진할 폴리펩티드 도메인을 암호하는 뉴클레오티드 서열에 sHASEGP를 연결시킬 수도 있다 (Kroll D J et al (1993) DNA Cell Biol 12: 441-53; 융합 단백질을 함유하는 벡터 내용 참고).

[0250] sHASEGP는 또한 단백질 정제를 촉진하기 위해 첨가된 하나 이상의 추가의 폴리펩티드 도메인을 갖는 재조합 단백질로서 발현될 수 있다. 그러한 정제 촉진 도메인은 고정된 금속에서의 정제를 허용하는 히스티딘-트립토판 분자와 같은 금속 킬레이팅 펩티드, 고정된 면역글로불린에서의 정제를 허용하는 단백질 A 도메인, 및 FLAGS 연장/친화성 정제 시스템(이뮤넥스 코포레이션, 와싱턴주 시애틀 소재)에서 이용되는 도메인을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 정제 도메인과 sHASEGP 사이에서 인자 XA 또는 엔테로키나제(인비트로겐, 캘리포니아주 샌디애고 소재)와 같은 절단성 링커 서열의 포함은 정제를 촉진하는 데 유용하다. 한가지 그러한 발현 벡터는 sHASEGP를 손상시키는 융합 단백질의 발현을 제공하며 티오레독신과 엔테로키나제 절단 부위가 이어지는 6 히스티딘 잔기를 암호하는 핵산을 함유한다. 히스티딘 잔기는 IMIAC(Porath et al (1992) Protein Expression and Purification 3:263-281에 개시된 고정된 금속 이온 친화성 크로마토그래피)에서의 정제를 촉진하는 한편 엔테로키나제 절단 부위는 융합 단백질로부터 케모카인을 정제하기 위한 수단을 제공한다.

[0251] 재조합 생산에 더하여, sHASEGP의 단편은 고체상 기법을 이용하는 직접 펩티드 합성(Stewart et al (1969) Solid- Phase Peptide Synthesis, W H Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85 : 2149-2154 참고)에 의해 생산될 수 있다. 생체외 단백질 합성은 수동 기법 또는 자동화에 의해 실시될 수 있다. 자동화 합성은 예를 들어 제조자에 의해 제공된 안내서에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 431A 펩티드 합성기(퍼킨 엘머, 캘리포니아주 포스터시 소재)를 이용하여 이루어질 수 있다. sHASEGP의 다양한 단편은 별도로 화학 합성되고 화학 방법으로 결합되어 전체-길이 분자를 생산할 수 있다.

[0252] sHASEGP 폴리펩티드의 암호 서열 또는 그 일부를 함유하는 발현 벡터는 예를 들어, 암호 부분을 세 가지 PGEX 벡터(글루타치온 S-트랜스퍼라제 발현 벡터(Smith and Johnson, Gene 7: 31-40(1988)) 각각의 EcoRI 제한 부위내로 서브클로닝하여 만들어진다. 이에 의해 정확한 판독 프레임으로 생성물이 발현된다. sHASEGP 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인의 발현을 위한 예시적인 벡터 및 시스템은 공지된 피치아 벡터(예를 들어, 인비트로겐에서 구할 수 있음), 특히 암호된 단백질의 분비를 위해 고안된 것들을 포함한다. 단백질은 또한 인클루젼 바디에서처럼 세포질에서 발현될 수 있다. 한가지 예시적인 벡터는 실시예에 개시된다.

[0253] 이.콜리 세포의 형질전환을 위한 플라스미드는 예를 들어, pET 발현 벡터를 포함한다 (미국 특허 제4,952,496호 참고; 위스콘신주 매디슨에 소재하는 노바겐에서 판매; 또한 상기 시스템을 설명하는 노바겐에 의해 공개된 문헌을 참고).

[0254] 그러한 플라스미드는 T7lac 프로모터, T7 종결인자, 유도성 이.콜리 lac 작동인자, 및 lac 억제인자 유전자를 함유하는 pET 11a; T7 프로모터, T7 종결인자, 및 이.콜리 OMPT 분비 시그널을 함유하는 pET 12A-C; 및 His 컬럼으로 정제하는 데 사용하기 위한 His-Tag 리더 서열 및 컬럼에서 정제 후 절단을 허용하는 트롬빈 절단 부위,

T7-lac 프로모터 영역 및 T7 종결인자를 함유하는 pET 15B 및 PET19B(노바겐)를 포함한다.

[0255] 벡터는 피치아 세포, 및 이.콜리와 같은 박테리아 세포와 같은 숙주 세포내로 도입되고, 단백질은 그안에서 발현된다. 예시적인 피치아 균주는 예를 들어 GS115를 포함한다. 예시적인 박테리아 숙주는 LACUV 프로모터(미국 특허 제5,952,496호 참고)와 같은 유도성 프로모터에 작동적으로 연결된 T7 RNA 폴리머라제를 암호하는 DNA의 염색체 카피를 함유한다. 그러한 숙주는 용균성 이.콜리 균주 BL21(DE3)을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0256] sHASEGP 도메인, 유도체 및 유사체는 공지된 다양한 방법으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 일단 sHASEGP 폴리펩티드, 또는 그 도메인, 단편 또는 유도체를 발현하는 재조합 세포가 확인되면, 개별 유전자 생성물이 분리되고 분석될 수 있다. 이것은 생성물의 방사성 표지 및 후속되는 젤 전기영동, 면역분석, 마커-표지된 생성물에의 가교, 및 단백질 분해 활성의 분석에 의한 분석을 포함하여 이에 한정되지 않는 단백질의 물리적 및/또는 기능적 특성에 기초한 분석에 의해 이루어진다.

[0257] sHASEGP 폴리펩티드는 컬럼 크로마토그래피(예, 이온 교환, 친화성, 젤 배제, 역상 고압 및 빠른 단백질 액체), 차등 원심분리, 차등 용해성, 또는 단백질 정제를 위해 이용되는 임의의 다른 표준 기법을 포함하며 이에 한정되지 않는 공지 방법에 의해 (복합체 또는 단백질을 발현하는 재조합 숙주 세포 또는 천연 공급원으로부터) 분리 및 정제될 수 있다.

[0258] 한 구체예에서, sHASEGP는 1) 접선 유동 정용여과, 2) 음이온 교환 크로마토그래피 결합 및 그로부터 용출, 3) 페닐 세파로즈 크로마토그래피를 통한 유동, 4) 페닐보로네이트 크로마토그래피 결합 및 그로부터 용출, 및 4) 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 결합 및 이를 이용한 용출에 의해, HZ24 형질감염되고 메토트렉세이트 증폭된 DG44 세포의 화학적으로 정의된 조절 배지로부터 균질하게 정제될 수 있다.

[0259] 기능적 특성은 공지된 임의의 적합한 분석을 이용하여 평가될 수 있다.

[0260] 다르게는, 일단 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 도메인 또는 유도체가 확인되면, 단백질의 아미노산 서열은 그것을 암호하는 유전자의 뉴클레오티드 서열로부터 추론될 수 있다. 그 결과, 단백질 또는 그 도메인 또는 유도체는 공지된 표준 화학 방법에 의해 합성되고(예, Hunkapiller et al, Nature 310: 105-111 (1984)) 이어서 생체외에서 당화될 수 있다.

[0261] sHASEGP 폴리펩티드 서열의 조작은 단백질 수준에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 당화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, PEG화, 공지의 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드에의 결합에 의해, 번역동안 또는 번역 후 차등적으로 변형되는 sHASEGP 폴리펩티드 단백질, 그 도메인, 그 유도체 또는 유사체 또는 단편 또한 여기서 고려된다.

[0262] 임의의 많은 화학적 변형이 시아노겐 브로마이드, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8, NABH4에 의한 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 산화, 환원, 투니카마이신 및 기타 그러한 제제의 존재하에서의 대사성 합성을 포함하며 이에 한정되지 않는 공지 기법에 의해 실시될 수 있다.

[0263] 또한, sHASEGP 폴리펩티드의 도메인, 유사체 및 유도체는 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 원하는 도메인을 포함하거나 생체외에서 원하는 활성을 매개하는 sHASEGP 폴리펩티드의 일부에 해당하는 펩티드는 펩티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

[0264] 더욱이, 원하면, 비고전적 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체가 치환 또는 첨가로서 sHASEGP 폴리펩티드 서열내로 도입될 수 있다.

[0265] 비고전적 아미노산은 혼한 아미노산의 D-이성질체, a-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노부티르산, E-ABU, e-Ahx, 6-아미노 헥사노산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루이신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사코신, 시트룰린, 시스테산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, β-알라닌, 플루오로-아미노산, β-메틸 아미노산과 같은 디자이너 아미노산, ca-메틸 아미노산, na-메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 아미노산은 d(우선성) 또는 l(좌선성)일 수 있다.

[0266] 천연 생성물이 돌연변이로 의심되거나 새로운 종으로부터 분리되는 경우, 생체외에서 발현된 것 또는 생체내 또는 생체외에서 합성 발현 벡터로부터 분리된 것뿐만 아니라 천연 공급원으로부터 분리된 sHASEGP 폴리펩티드의 아미노산 서열은 DNA 서열의 분석으로 결정하거나 또는 다르게는 분리된 단백질을 직접 서열 결정하여 결정할 수 있다. 그러한 분석은 수동 서열 결정에 의해 또는 자동화된 아미노산 서열결정기를 사용하여 실시할 수

있다.

[0267] 변형 - sHASEGP 폴리펩티드 및 도메인의 다양한 변형이 여기서 고려된다. sHASEGP-암호 핵산 분자는 공지된 많은 전략에 의해 변형될 수 있다 (Sambrook ET A/. (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). 상기 서열은 제한 엔도뉴클레아제로 적절한 부위에서 절단되고, 이어서 필요하면 추가로 효소적으로 변형되고, 분리되고 생체외에서 결찰될 수 있다. sHASEGP의 도메인, 유도체 또는 유사체를 암호하는 유전자의 생산에서는, 변형된 유전자가 원하는 활성이 암호되는 유전자 영역에서 번역 중지 시그널에 의해 방해되지 않고, 원래의 번역 판독 프레임을 보유하도록 주의해야 한다.

[0268] 부가적으로, sHASEGP-암호 핵산 분자는 생체외 또는 생체내에서 돌연변이되어 번역, 개시, 및/또는 종결 서열을 생성 및/또는 파괴하거나, 또는 암호 영역에서 변화를 만들고/거나 새로운 제한 엔도뉴클레아제 부위를 형성하거나 또는 기존의 것을 파괴하거나, 추가의 생체외 변형을 촉진할 수 있다. 또한, 여기서 개시된 대로 Cys 잔기의 치환 및 당화 부위의 제거 또는 첨가와 같은 일차 서열 변화를 갖는 뮤테인이 고려되며; 서열 번호 1의 sHASEGP는 7개의 잠재적인 당화 부위를 갖는다. 그러한 돌연변이는 화학적 돌연변이유발 및 생체외 부위-지시된 돌연변이유발(Hutchinson et al., j. Biol. Chem. 253: 6551-6558(1978)), TABE 링커(파마시아)의 사용을 비제한적으로 포함하는 공지의 돌연변이유발 기법에 의해 이루어질 수 있다. 한 구체예에서는, 예를 들어, sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 도메인은 형광 라벨을 포함하도록 변형된다. 다른 구체적인 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드는 이종이기능성 시약을 갖도록 변형되며, 그러한 이종이기능성 시약은 복합체의 구성원을 가교시키기 위해 이용될 수 있다.

[0269] 또한, sHASEGP의 도메인, 유사체 및 유도체는 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 원하는 도메인을 포함하거나 원하는 활성을 생체외에서 매개하는, sHASEGP의 일부에 해당하는 펩티드는 펩티드 합성기를 사용하여 합성할 수 있다. 또한, 필요하면, 비고전적 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체를 sHASEGP 서열내로 치환 또는 첨가로서 도입할 수 있다. 비고전적 아미노산은 흔한 아미노산의 D-이성질체, a-아미노 부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노부티르산, S-ABU, e-Ahx, 6-아미노 헥사노산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루이신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사코신, 시트룰린, 시스테인산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, β-알라닌, 플루오로-아미노산, 티-메틸 아미노산, ca-메틸 아미노산, na-메틸 아미노산과 같은 디자이너 아미노산, 및 일반적인 아미노산 유사체를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 아미노산은 d(우선성) 또는 1(좌선성)일수 있다.

[0270] **F. N-결합된 당 모이어티를 갖는 기능적으로 활성인 당화된 sHASEGP의 개요**

[0271] 적절하게 N-당화된 사람 sHASEGP는 촉매적으로 안정한 단백질의 생성에 필요하다. sHASEGP의 N-결합된 당화는 다양한 기법을 통해 이루어질 수 있다. sHASEGP의 당화는 sHASEGP를 암호하는 핵산을 적절한 N-결합된 당화를 할 수 있는 진핵 기원의 세포내로 도입하거나, 또는 다르게는 sHASEGP 폴리펩티드를 원하는 N-결합된 당 모이어티를 도입할 수 있는 무세포 추출물 또는 정제된 효소와 접촉시켜 이루어질 수 있다.

[0272] 발현 시스템의 선택

[0273] 진핵 세포 발현 시스템은 그들이 전위적으로 발현된 폴리펩티드내로 도입하는 당화의 정도 및 타입에서 다양하다. 예를 들어, CHO 세포는 활성 sHASEGP 폴리펩티드내로 N-결합된 당화를 도입하는 데 있어서 매우 효율적이다.

[0274] 기능적인 sHASEGP 생성물을 생성하기 위해 N-결합된 당화를 도입하는 추가의 진핵성 발현 시스템은 사람 sHASEGP 발현 플라스미드를 상기 세포내로 도입하고 중성 활성에 대해 시험함으로써 시험될 수 있다. 적절한 N-결합된 당화는 PNG아제 방출된 올리고당의 FACE 분석으로 결정할 수 있다. 촉매적으로 활성인 sHASEGP의 당화 프로파일이 추가로 여기서 제공된다. 당화의 확인은 또한 PNG아제-F로 상기 세포로부터의 sHASEGP를 처리하거나 또는 sHASEGP 암호 핵산의 도입 후 투니카마이신에서 그러한 세포를 성장시켜 이루어질 수 있다.

[0275] 생체외에서 sHASEGP 폴리펩티드의 N-당화. sHASEGP 폴리펩티드는 개과 마이크로좀 막과 같은 sHASEGP 폴리펩티드에 N-결합된 당을 전달할 수 있는 활성을 함유한 무세포 추출물과 sHASEGP 폴리펩티드를 접촉시키거나, 또는 시판되는(프로메가, 위스콘신주의 매디슨에 소재) 결합된 전사 및 번역을 통해 N-당화될 수 있다.

[0276] 올리고당류는 환원성 말단의 당이 실제 환원당이건 아니건 간에, 환원성 말단과 비환원성 말단을 갖는 것으로 생각된다. 허용된 명명법에 따라, 올리고당은 왼쪽의 비환원성 말단 및 오른쪽의 환원성 말단으로 묘사된다. 여기서 개시된 모든 올리고당은 비환원당의 명칭 또는 약자(예, Gal), 이어서 글리코시드 결합의 형태(.알파 또는

.베타), 고리 결합, 결합에 관련된 환원성 당의 고리 위치, 및 이어서 환원성 당의 명칭 또는 약자(예, GlcNAc)로 표시된다. 두 당 사이의 연결은 예를 들어 2,3,2.fw darw.3, 또는 (2,3).으로 표현될 수 있다. 각 당은 피라노즈이다.

[0277] 본원에서 사용된 것으로서, N-결합된 당 모이어티는 Asn 잔기의 아미드 질소를 통하여 sHASEGP에 부착된 올리고당을 말한다. N-결합된 올리고당은 몇 가지 주요 타입으로 나뉘며(올리고만노즈, 복합체, 하이브리드, 황화), 이들 모두는 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 서열(여기서 Xaa는 Pro가 아님)내에 속하는 Asn 잔기의 아미드 질소를 통하여 부착된 (Man) 3- GlcNAc-GlcNAc-코어를 갖는다. N-결합된 부위는 종종 서열 결정동안 "블랭크" 사이클의 출현에 의해 간접적으로 지정된다. 당화된 Asn을 Asp로 전환시키는 PNG아제 F에 의해 올리고당을 방출시킨 후 양성 확인이 이루어질 수 있다. PNG아제 F 방출 후, N-결합된 올리고당은 Bio-Gel P-6 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있으며, 올리고당 풀은 제조성 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC)에 노출된다 (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem.182, 1-8). 일부 올리고당 이성질체는 HPAEC를 이용하여 분리될 수 있다. 푸코스 잔기는 HPAEC 크로마토그램에서 용출 위치를 더 앞으로 이동시킬 것이며, 한편 추가의 시알산 잔기는 보유 시간을 증가시킬 것이다. 올리고당 구조가 공지된 당단백질(예, 소 페투인, a-1 산 당단백질, 난백알부민, RNAse B, 트랜스페린)을 동시에 처리하면 올리고당 피크의 지정을 촉진할 수 있다. 수집된 올리고당은 조성 분석 및 메틸화 결합 분석의 조합에 의해 특징을 규명하며(Waegheet al., (1983) Carbohydr Res. 123,281-304.), 이때 아노머 형태는 NMR 분광광도법에 의해 지정된다 (Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230).

[0278] 다르게는, 올리고당은 형광 보조 탄수화물 전기영동(FACE)에 의해 확인할 수 있다 (Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281).

[0279] **G. sHASEGP상의 N-결합된 당 모이어티의 검출 및 특징규명**

[0280] 단백질이 실제로 당화되었는지를 결정하는 것은 당단백질 글리칸 분석의 시작 단계이다. 소듐 도데실 설페이트의 존재하에서의 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-PAGE)은 단백질 서열결정에 앞서 마지막 단계로서 선택되는 방법이 되었다. 당화된 단백질은 종종 SDS-PAGE에 의해 확산 밴드로서 이동한다. 펩티드-N4-(N-아세틸-D-글루코스아미닐)아스파라긴 아미다제(PNG아제 F)로 처리 후 밴드폭의 주목할만한 감소 및 이동 위치의 변화는 N-결합된 당화의 진단으로 고려된다. 만일 다른 타입의 당화가 주가 되면, 다른 접근법을 이용해야 한다. 렉틴 블롯팅 방법은 당화의 부류(N 대 O)와 무관한 접근을 제공한다. 다양한 식물 조직으로부터의 탄수화물-결합 단백질인 렉틴은 당단백질 글리칸에서 발견되는 광범위한 한정된 당 에피토프에 대해 높은 친화성 및 좁은 특이성을 갖는다 (Cummings, R. D. (1994) Methods in Enzymol. 230,66-86.). 비오틴 또는 딕옥시제닌과 접합될 때, 이들은 웨스턴 블롯팅에서 이용되는 이차 항체-알카라인 포스파타제 반응과 유사하게, 알카라인 포스파타제와 접합된 아비딘 또는 항-딕옥시제닌 항체를 이용하여 비색 반응을 통해 막 블롯에서 쉽게 확인될 수 있다 (Haselbeck, et al. (1993) Methods in Mol. Biol. 14,161-173.). 잘 한정된 특이성을 갖는 렉틴 패널을 이용한 스크리닝은 당단백질의 탄수화물 보체에 대해 상당한 정보를 제공할 수 있다. 중요하게도, 색상 발색 증폭은 10-50 ng의 당단백질이 SDS-PAGE의 막 블롯에서 쉽게 보여질 수 있을 정도로 충분히 높다. 렉틴이 그들의 짝 리간드에 대해 매우 높은 친화성을 나타냄에도 불구하고, 일부는 구조적으로 관련된 에피토프에 대해 상당한 친화성을 나타낸다. 따라서, 렉틴 패널을 선택할 때 교차반응성의 가능성을 주의깊게 주목하는 것이 중요하며, O-결합된 구조로부터 복합체, 하이브리드 및 고 만노스 N-결합된 글리칸을 개별적으로 구별할 확률이 가장 높은 것을 적용하는 것이 중요하다.

[0281] 단당류 분석 또한 sHASEGP가 당화되는지를 결정하기 위해 이용될 수 있으며, 렉틴 분석의 경우처럼 구조적 특징에 대한 추가의 정보를 제공한다. 정량적 단당류 조성 분석은 i) 당화된 단백질을 확인하고, ii) 개별 당 대 단백질의 몰 비를 제공하며, iii) 일부 경우에는, 올리고당 부류의 존재를 제안하며, iv) 구조적 확인 전략을 고안하는 데 있어 제 1 단계이며, 그리고 v) 재조합 당단백질 치료제를 위한 생산 일관성의 척도를 제공한다. 최근에는 펄스된 전류측정 검출을 갖는 고-pH 음이온-교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD)가 단당류 조성을 결정하는 데 광범위하게 이용되었다 (Townsend, et al. (1995) in Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis (Z. El Rassi ed.).pp. 181-209.). 보다 최근에는, 형광단-계 표지화 방법이 도입되었으며 다수가 키트 형태로 이용가능하다. 형광 방법의 뚜렷한 잇점은 민감성의 증가(50-배)이다. 한 가지 잠재적인 단점은 다른 단당류는 가수분해물에서 또는 외부 표준 혼합물에서, 커플링 반응동안 형광단에 대해 상이한 선택성을 나타낼 수 있다는 것이다. 하지만, 민감성의 증가 및 이용가능한 당단백질의 전체양의 작은 일부로부터 어느 단당류가 존재하는지를 확인하는 능력, 및 레이저 도입된 형광을 이용하는 더큰 민감성의 잠재력은 이 접근법을 더 매력적으로 만든다.

[0282] 소량의 sHASEGP의 단당류 조성 분석은, 전기 블롯팅 (Weitzhandleret al, (1993) J. Biol. Chem. 268,5121-5130.) 또는 더 작은 양이 분석된다면 돗 블롯 후, PVDF(PSQ) 막에서 최상으로 실시된다. PVDF는 단당류 또는 올리고당류가 일단 산 또는 효소 가수분해에 의해 방출되면 막에 결합하지 않으므로, 탄수화물 분석에 이상적인 매트릭스이다.

[0283] FACE 분석은 sHASEGP의 당화 프로파일의 검출에 효과적인 수단이다. 30% 올리고당 젤을 이용하는 FACE®

N-결합된 올리고당 프로파일링(프로자임)이 한 가지 그러한 기작이다. N-글리카나제(a.k.a PNG아제)를 이용한 효소 분해에 의해 100 ㎍의 당단백질로부터 절단되고, 형광단 ANTS를 이용하여 표지되고, 전기영동에 의해 분리된 올리고당은 sHASEGP 당화 프로파일의 검출에 이용될 수 있다. 올리고당 밴드의 상대적인 위치는 중합도(DP) 단위로 이동 거리를 표시하는 올리고당 표준 래더를 따라 샘플 및 샘플 희석액을 러닝시켜 결정된다.

[0284] **H. sHASEGP 활성을 조절하는 화합물을 확인하는 스크리닝 방법**

[0285] 몇 가지 타입의 분석이 여기서 예시되고 개시된다. 하이알우로니다제 도메인이 다른 분석에서 이용될 수 있다. 하지만, 하이알우로니다제 도메인은 촉매 활성을 나타내는 것으로 여기서 나타난다.

[0286] 따라서 이들은 생체외 스크리닝 분석에 이상적이다.

[0287] 이들은 또한 결합 분석에 이용될 수 있다.

[0288] sHASEGP 전체-길이 자이모겐, 활성 효소, 및 하이알우로니다제 도메인이 여기서 제공된 것들을 비롯하여 공지된 임의의 스크리닝 분석에 사용하도록 고려된다. 따라서, 하이알우로니다제 분석에 적용된다면, 하기 설명은 sHASEGP를 비롯한 임의의 하이알우로니다제의 단일쇄 하이알우로니다제 도메인 또는 그 촉매 활성 부분의 사용에 적용하는 것을 의도한다. 그 스플라이스 변이체와 같은 임의의 변이체를 비롯한, sHASEGP와 사용하기 위한, 결합 분석과 같은 다른 분석이 여기서 제공된다.

[0289] 1. sHASEGP 단백질의 하이알우로니다제 활성을 조절하는 제제의 확인을 위한 촉매 분석.

[0290] sHASEGP, 특히 단일쇄 하이알우로니다제 도메인 또는 그 촉매 활성 부분의 촉매 활성의 조절자를 확인하기 위한 방법이 여기서 제공된다. 상기 방법은 sHASEGP, 전체-길이 자이모겐 또는 활성 형태, 및 특히 그 단일쇄 도메인을 시험 물질 존재하에서 sHASEGP의 기질과 접촉시키고, sHASEGP의 활성을 평가되는, 기질의 단백질분해를 검출하고, 활성을 대조군과 비교함으로써 실시될 수 있다. 예를 들어, 대조군은 전체-길이 자이모겐 또는 활성 형태, 및 특히 그 단일쇄 도메인을 비롯한 sHASEGP를 sHASEGP의 기질과 접촉시키고, 기질의 단백질분해를 검출하고, sHASEGP의 활성을 평가함으로써 평가된 sHASEGP의 활성일 수 있다. 시험 화합물의 존재 및 부재에서의 결과를 비교한다. 활성의 차이는 시험 물질이 sHASEGP의 활성을 조절함을 나타낸다. sHASEGP 활성화 절단의 활성인자 또한 고려되며, 그러한 분석이 하기에 개시된다.

[0291] 한 구체예에서는, 상기 스크리닝 방법에서 다수의 시험 물질이 동시에 스크린된다. 다른 구체예에서는, sHASEGP가 표적 세포에 잠재적으로 특이적인 제제를 확인하기 위한 수단으로서 표적 세포로부터 분리된다.

[0292] 다른 구체예에서는, 시험 물질은 치료 화합물이며, 시험 물질의 존재 및 부재에서 측정된 sHASEGP 활성의 차이는 표적 세포가 치료 화합물에 반응함을 나타낸다.

[0293] 한 가지 방법은 (a) sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 하이알우로니다제 도메인을 리간드와 화합물 사이의 상호작용을 유도하는 조건하에서 하나 또는 다수의 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 다수중에서, 리간드에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 화합물을 확인하는 단계를 포함한다.

[0294] 여기서 제공된 다른 방법은 a) sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 하이알우로니다제 도메인을 sHASEGP 폴리펩티드의 기질과 접촉시키고, 기질의 분해를 검출하여 이에 의해 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 평가하는 단계; b) 시험 물질의 존재하에서 sHASEGP 폴리펩티드를 sHASEGP 폴리펩티드의 기질과 접촉시키고, 기질의 분해를 검출하고 이에 의해 sHASEGP 폴리펩티드의 활성이 평가되는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 평가된 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 비교하여 이에 의해 단계 a)에서 측정된 활성이 단계 b)에서 측정된 활성과 상이함은 시험 물질이 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 조절함을 나타내는 단계를 포함한다.

[0295] 다른 구체예에서는, 다수의 시험 물질이 동시에 스크린된다. 시험 물질이 sHASEGP 폴리펩티드의 조절자인지를 평가하기 위해 시험 물질의 존재 및 부재하에서 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 비교하는 데 있어서, 평행 측정이 일반적임에도 불구하고, 평행으로 활성을 분석하는 것이 불필요하다. 한 시점에서 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을

측정하고 측정된 활성을 sHASEGP 폴리펩티드의 활성의 역사적 값에 비교하는 것이 가능하다.

[0296] 예를 들어, 시험 물질의 존재하에서 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 측정하고 시험 물질의 부재하에서 이전에 측정된 sHASEGP 폴리펩티드의 활성의 역사적 값을 비교하거나 그 역일 수 있다. 이것은 예를 들어, 분석을 실시하기 위한 키트에 제공된 삽입물 또는 팜플렛상에 sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 제공함으로써 이루어질 수 있다.

[0297] 특정 sHASEGP를 위한 기질을 선택하는 방법은 실시예에 개시되며, 구체적인 하이알우로니다제 분석이 예시된다.

[0298] 조합 및 선택적으로 분석을 실시하기 위한 안내서를 포함하는 조합을 함유하는 키트가 제공된다. 상기 조합은 sHASEGP 폴리펩티드 및 분석될 sHASEGP 폴리펩티드의 기질을 포함하며; 그리고, 선택적으로 기질의 단백질분해를 검출하기 위한 시약을 포함한다. 특정 sHASEGP 폴리펩티드에 의한 단백질 분해에 노출되는, 글리코스아미노글리칸을 비롯한, 발색성 또는 형광성 분자일 수 있는 기질은 sHASEGP 폴리펩티드가 시험 기질을 절단하는 능력을 시험함으로써 실험적으로 확인될 수 있다. 최저 농도에서 및/또는 가장 빠른 속도로 또는 원하는 조건하에서 가장 효과적으로 절단되는 기질이 확인된다.

[0299] 전술한 조합을 함유하는 키트가 추가로 제공된다. 상기 키트는 선택적으로 sHASEGP 폴리펩티드의 활성의 조절자를 확인하기 위한 안내서를 포함한다. 임의의 sHASEGP 폴리펩티드는 그 활성의 조절자의 확인을 위한 표적으로 고려된다.

[0300] 2. 결합 분석.

[0301] sHASEGP에 결합하는 제제, 특히 화합물의 확인 및 분리를 위한 방법이 또한 여기서 제공된다. 상기 분석은 분리된 하이알우로니다제 도메인(또는 sHASEGP 폴리펩티드의 하이알우로니다제 도메인을 함유하는, sHASEGP 폴리펩티드외의 단백질), 및 전체-길이 자이모겐 또는 확장된 하이알우로니다제 도메인으로부터 유래된 활성 형태를 비롯한 활성 형태에 결합하는 제제를 확인하기 위해 고안된다. 확인된 화합물은 비정상 하이알우로니다제 활성에 관련된 질환 및 질병의 치료를 위한 화합물의 확인을 위한 후보자 또는 선도이다. 상기 방법에 이용된 sHASEGP 폴리펩티드는 sHASEGP 단일쇄 하이알우로니다제 도메인 또는 그 단백질분해 활성 부분을 비롯한, 여기서 정의된 임의의 sHASEGP 폴리펩티드를 포함한다.

[0302] 다양한 방법이 여기서 제공된다. 이들 방법은 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 하이알우로니다제 도메인이 직접 또는 링커를 통하여 간접적으로 고체 지지체에 결합되는 고체상 반응 또는 용액에서 실시될 수 있다. 스크리닝 분석은 실시예에서 개시되며, 이들 분석은 후보 화합물을 확인하기 위해 이용되어 왔다.

[0303] 여기서의 목적을 위해, 전술한 모든 결합 분석이 sHASEGP에 대해 제공된다.

[0304] sHASEGP 단일쇄 하이알우로니다제 도메인, 전체-길이 활성 sHASEGP 또는 그 2쇄 하이알우로니다제 도메인에 특이적으로 결합하는 화합물과 같은 제제를 확인하기 위한 방법이 여기서 제공된다. 상기 방법은 (a) sHASEGP를 sHASEGP와 제제 사이의 결합을 유도하는 조건하에서 시험 제제 하나 또는 다수와 접촉시키고; (b) sHASEGP에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제제를 다수내에서 확인하는 것에 의해 실시될 수 있다.

[0305] 예를 들어, 그러한 방법을 실시함에 있어서, sHASEGP 폴리펩티드는 잠재적인 결합 파트너와 폴리펩티드의 연합을 허용하는 조건하에서 잠재적인 결합 파트너 또는 세포의 추출물 또는 분획과 혼합된다. 혼합 후, sHASEGP와 연합된 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 다른 분자를 혼합물로부터 분리한다. 이어서 sHASEGP에 결합된 결합 파트너를 제거하여 분석할 수 있다. 결합 파트너를 확인하고 분리하기 위하여, 전체 단백질, 예를 들어, 서열번호 1의 전체 개시 단백질을 이용할 수 있다. 다르게는, 단백질의 단편을 이용할 수 있다.

[0306] 다양한 방법을 이용하여 세포 추출물, 또는 혈액, 혈청, 소변, 땀, 활액, CSF 및 기타 그러한 액과 같은 체액을 얻을 수 있다.

[0307] 예를 들어, 물리적 또는 화학적 파괴 방법을 이용하여 세포를 파괴할 수 있다. 물리적 파괴 방법의 예는 초음파처리 및 기계적 전단을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 화학적 용해 방법의 예는 계면활성제 용해 및 효소 용해를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 추출물을 얻기 위해 세포 추출물을 제조하기 위해 방법을 쉽게 적응시킬 수 있다.

[0308] 일단 세포 추출물이 제조되면, 결합 파트너와 단백질의 연합이 발생할 수 있는 조건하에서 추출물을 sHASEGP와 혼합한다. 사람 세포의 세포질 또는 혈액과 같은 체액에서 발견되는 조건과 유사한 조건을 비롯한, 다양한 조건을 이용할 수 있다. 삼투압, pH, 온도, 및 이용되는 세포 추출물의 농도와 같은 특징들은 결합 파트너와 단백질의 연합을 최적화하기 위해 변화될 수 있다. 유사하게, 대상 분자를 체액에서 분리하는 방법이 공지되어 있다.

[0309] 적절한 조건하에서 혼합한 후, 결합된 복합체를 혼합물로부터 분리한다. 다양한 기법을 이용하여 혼합물을 분리할 수 있다. 예를 들어, sHASEGP에 특이적인 항체를 이용하여 결합 파트너 복합체를 면역침전시킬 수 있다. 다르게는, 크로마토그래피 및 밀도/침강 원심분리와 같은 표준 화학 분리 기법을 이용할 수 있다.

[0310] 추출물에서 비연합 세포 구성원을 제거한 후, 결합 파트너는 종래의 방법을 이용하여 복합체로부터 해리될 수 있다. 예를 들어, 혼합물의 염 농도 또는 pH를 변화시켜 해리시킬 수 있다.

[0311] 연합된 결합 파트너 쌍을 혼합된 추출물로부터 분리하는 것을 돕기 위하여, sHASEGP는 고체 지지체에 고정될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 니트로셀룰로스 매트릭스 또는 아크릴 비드에 부착될 수 있다. 단백질 또는 그 단편의 고체 지지체에의 부착은 추출물에서 발견되는 다른 구성원으로부터 펩티드/결합 파트너 쌍을 분리시키는 것을 돕는다. 확인된 결합 파트너는 단일 단백질 또는 둘 이상의 단백질로 구성된 복합체일 수 있다.

[0312] 다르게는, 단일쇄 하이알우로니다제를 암호하는 핵산 분자는 효모 이-하이브리드 시스템에서 이용될 수 있다. 효모 이-하이브리드 시스템은 다른 단백질 파트너 쌍을 확인하기 위해 이용되어 왔으며 여기서 개시된 핵산 분자를 이용하도록 쉽게 적응될 수 있다.

[0313] 특히 sHASEGP를 위한 다른 생체외 결합 분석은 이들 단백질 중 하나의 적어도 촉매 도메인을 함유하는 폴리펩티드 및 하나 이상의 후보 결합 표적 또는 기질의 혼합물을 이용한다. 적절한 조건하에서 혼합물을 항온처리한 후, sHASEGP 또는 촉매 도메인을 함유하는 그 폴리펩티드 단편이 후보 기질과 결합하거나 상호작용하는 능력이 평가된다. 무세포 결합 분석의 경우, 성분중의 하나는 검출가능한 라벨을 포함하거나 여기에 결합된다. 라벨은 방사성활성, 발광, 광학적 또는 전자 밀도 등과 같은 직접 검출, 또는 에피토프 태그, 효소 등과 같은 간접 검출을 제공할 수 있다. 라벨 및 다른 분석 성분의 특성에 따라 다양한 방법을 이용하여 라벨을 검출할 수 있다. 예를 들어, 라벨은 고체 기질에 결합되어 검출되거나 또는 라벨을 함유한 결합 복합체의 일부가 고체 기질로부터 분리되고 이어서 라벨이 검출될 수 있다.

[0314] 3. 막 고정 단백질인 시그널 전달 sHASEGP의 검출은 직접 또는 간접적으로 시그널 전달에 관련될 수 있으며 세포 표면 수용체로서 직접 또는 시그널 전달을 시작할 수 있는 프로-성장 인자와 같은 단백질을 활성화시킴에 의해 간접적으로 관련될 수 있다.

[0315] 또한, 서열 번호 4에 개시된 sHASEGP의 가용성 도메인과 같은 분비된 sHASEGP는 세포 표면 수용체에 결합하거나 이와 상호작용함으로써 직접, 또는 시그널 전달을 개시할 수 있는 프로-성장 인자와 같은 단백질을 활성화시킴으로써 간접적으로 시그널 전달에 관련될 수 있다. 시그널 전달을 평가하기 위한 분석은 공지되어 있으며, sHASEGP 폴리펩티드와 사용하기 위해 적응될 수 있다.

[0316] 직접 또는 프로-성장 인자의 활성화를 통해서와 같이 간접적으로, sHASEGP, 특히 전체-길이 또는 세포외 도메인 또는 sHASEGP의 기능성 부분을 세포의 표면에 고정시키기에 충분한 부분에 의해 매개되는 시그널 전달에 영향을 주거나 변화시키는 제제를 확인하기 위한 분석이 제공된다. 그러한 분석은 예를 들어, 전달된 시그널의 조절이 리포터 유전자로부터의 발현에의 효과를 검출함으로써 평가되는 전사계 분석을 포함한다 (예, 미국 특허 제5,436,128호).

[0317] 4. sHASEGP를 암호하는 핵산의 발현을 조절하는 제제를 확인하기 위한 방법.

[0318] 다른 구체예는 sHASEGP를 암호하는 핵산의 발현을 조절하는 제제를 확인하기 위한 방법을 제공한다. 그러한 분석은 sHASEGP를 암호하는 핵산의 발현 수준의 변화를 모니터하는 임의의 이용가능한 수단을 이용한다.

[0319] 분석 포맷을 이용하여 제제가 sHASEGP를 암호하는 핵산의 발현을 조절하는 능력을 조절할 수 있다. 예를 들어, mRNA 발현은 핵산에의 하이브리드화에 의해 직접 모니터될 수 있다. 전술한 효소 분석 또한 sHASEGP의 발현을 조절하는 제제를 검출하기 위해 이용될 수 있다.

[0320] 세포주는 적절한 조건 및 시간에서 시험될 제제에 노출되며, 전체 RNA 또는 mRNA는 표준 과정에 의해 분리된다 (예, Sambrook et al (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). 시약에 노출된 세포와 대조군 세포 사이에서 RNA 발현 수준의 차이를 검출할 프로브는 핵산으로부터 제조될 수 있다. 높은 엄격도의 조건하에서 표적 핵산과만 하이브리드하는 프로브를 고안하는 것이 일반적이지만, 필수적이지는 않다. 단지 매우 상보적인 핵산 하이브리드만이 높은 엄격도 조건하에서 형성된다. 따라서, 분석 조건의 엄격도는 하이브리드를 형성하기 위하여 두 핵산 쇄 간에 존재해야 하는 상보성의 양을 결정한다. 엄격도는 프로브:표적 하이브리드와 잠재적 프로브:비-표적 하이브리드 사이에서 안정성의 차이를 최대화하도록 선택된다.

[0321] 예를 들어, sHASEGP의 N- 및 C-말단 단편은 박테리아에서 발현되어, 이들 단편에 결합하는 단백질의 조사를 위해 이용될 수 있다. sHASEGP의 N- 또는 C-말단 영역에의 His-tag 또는 GST 융합과 같은 융합 단백질을 제조하여 기질로 사용할 수 있다. 이들 융합 단백질은 예를 들어, 글루타치온-세파로즈 비드에 결합되고 이어서 세포 용해물 또는 체액으로 탐침될 수 있다. 용해에 앞서, 세포 또는 체액을 sHASEGP 또는 그위의 도메인과 상호작용하는 단백질을 조절할 수 있는 후보 제제로 처리할 수 있다. 융합 단백질에의 용해물 단백질 결합은 SDS-PAGE에 의해 구별되고, 분리되고 이어서 단백질 서열결정 또는 질량 분광법에 의해 확인될 수 있다.

[0322] 항체 프로브는 충분한 길이라면(예, sHASEGP 폴리펩티드의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 그 이상의 연속적인 아미노산) 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 면역원성 증가에 필요하다면, 적합한 담체에 접합된 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 이용하여 적절한 면역화 프로토콜에서 적합한 포유류 숙주를 면역화시켜 제조된다. 소 혈청 알부민(BSA), 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 또는 다른 담체 단백질과 같은 담체와의 면역원성 접합체를 제조하는 방법은 공지되어 있다. 일부 환경에서, 예를 들어 카르보디이미드 시약을 이용한 직접 접합이 효과적일 수 있으며; 다른 경우에는 피어스 케미컬 컴퍼니(일리노이주 락포드에 소재)에 의해 공급되는 것과 같은 연결 시약이 합텐에의 접근성을 제공하기에 바람직할 수 있다. 합텐 펩티드는 Cys 잔기로 아미노 또는 카르복시 말단에서 연장되거나 또는 예를 들어 담체에의 연결을 촉진하기 위하여 시스테인 잔기가 개재될 수 있다.

[0323] 면역원의 투여는 일반적으로 적절한 기간동안 적절한 아쥬반트를 사용하여 주사하여 이루어진다. 면역화 스케쥴 동안, 항체의 역가를 취하여 항체 형성의 적정성을 결정한다.

[0324] 항-펩티드 항체는 예를 들어 sHASEGP의 카르복시 말단 아미노산에 해당하는 합성 펩티드를 이용하여 생성될 수 있다.

[0325] 합성 펩티드는 1-3 아미노산 길이, 일반적으로 적어도 4 이상 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 펩티드는 표준 방법을 이용하여 KLH에 결합될 수 있으며, 토끼 또는 유제류와 같은 동물내로 면역화될 수 있다. 이어서 폴리클로날 항체를 예를 들어, 공유 결합된 펩티드를 함유한 액티겔 비드를 이용하여 정제할 수 있다.

[0326] 이 방식으로 생산된 폴리클로날 항혈청이 일부 용례에는 만족스러울 수 있지만, 약학 조성물의 경우, 모노클로날 제제의 사용이 일반적으로 이용된다. 원하는 모노클로날 항체를 분비하는 불멸화 세포주를 쾰러 등 (Nature 256: 495-7 (1975))의 표준 방법을 이용하거나 또는 림프구 또는 비장 세포의 불멸화를 일으키는 변형을 이용하여 제조될 수 있다. 원하는 항체를 분비하는 불멸화된 세포주는 항원이 펩티드 합텐, 폴리펩티드 또는 단백질인 면역분석에 의해 스크린된다.

[0327] 원하는 항체를 분비하는 적절한 불멸화된 세포 배양물이 확인될 때, 세포는 생체외에서 또는 복수를 통하여 생체내에서 생산함으로써 배양될 수 있다. sHASEGP의 촉매 도메인 또는 활성화 절단 부위(영역)을 인식하는 모노클로날 항체가 특히 관심의 대상이다.

[0328] 항체 또는 단편이 또한 생산될 수 있다. 수용체의 원하는 영역에 특이적으로 결합하는 영역이 또한 다수 종 기원을 갖는 키메라로 생산될 수 있다.

[0329] 상기 방법으로 분석되는 제제는 임의로 선택되거나 또는 이성적으로 선택되거나 고안될 수 있다.

[0330] 상기 제제는 예를 들어, 펩티드, 작은 분자, 및 탄수화물일 수 있다. 당업자는 제제의 구조적 특성에 제한이 없음을 인식할 수 있다.

[0331] 펩티드 제제는 공지된 대로, 표준 고체상(또는 용액상) 펩티드 합성 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 또한, 이들 펩티드를 암호하는 DNA는 시판되는 올리고뉴클레오티드 합성 기구를 이용하여 합성되고, 표준 재조합 생산 시스템을 이용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 고체상 펩티드 합성을 이용하는 생산은 비-유전자 암호된 아미노산이 포함되면 필요하다.

[0332] **I. 치료 방법**

[0333] 본 방법에 의해 확인된 sHASEGP는 동물, 특히 사람을 비롯한 포유류에서 sHASEGP 기질의 비정상적인 축적을 치료하거나 방지하기 위해 이용된다. 한 구체예에서는, 상기 방법은 유효량의 sHASEGP 당단백질을 포유류에 투여하여 이에 의해 질병 또는 질환이 치료되거나 방지되는 것을 포함한다.

[0334] 다른 구체예에서는, sHASEGP 억제자를 과다한 양의 중성 하이알우로니다제 활성의 치료에 이용할 수 있다. 치료되는 포유류는 사람일 수 있다. 여기서 제공되는 억제자는 스크리닝 분석에 의해 확인된 것들이다. 또한, 항체

및 안티센스 핵산 또는 RNAi와 같은 이중쇄 RNA(dsRNA)가 고려된다.

[0335] 1. 안티센스 치료: 전술한 대로, 특정 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드 기능은 과다한 콘드로이티나제 활성을 치료하거나 방지하기 위하여, sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산에 의해 감소되거나 억제된다. sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 일부를 암호하는 유전자 또는 cDNA에 대해 안티센스인, 적어도 6 뉴클레오티드, 일반적으로 최대 약 150 뉴클레오티드의 핵산의 치료적 또는 예방적 사용이 제공된다. 여기서 이용되는 sHASEGP 폴리펩티드 "안티센스" 핵산은 일부 서열 상보성에 의해 그리고 대개 높은 엄격도 조건하에서 sHASEGP 폴리펩티드 RNA(대개 mRNA)의 일부에 하이브리드할 수 있는 핵산을 말한다. 안티센스 핵산은 sHASEGP 폴리펩티드 mRNA의 암호 및/또는 비암호 영역에 상보적일 수 있다. 그러한 안티센스 핵산은 sHASEGP 폴리펩티드 기능을 감소시키거나 억제하는 치료제로서 유용성을 가지며, 전술한 질환의 치료 또는 방지에 이용될 수 있다.

[0336] sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산은 적어도 6 뉴클레오티드이며 대개 올리고뉴클레오티드(6 내지 약 150 뉴클레오티드(6 내지 50 뉴클레오티드 포함) 범위)이다. 안티센스 분자는 하이알우로니다제 도메인의 모두 또는 일부에 상보성일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 적어도 10 뉴클레오티드, 적어도 15 뉴클레오티드, 적어도 100 뉴클레오티드, 또는 적어도 125 뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 또는 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 그 변형 버젼, 단일쇄 또는 이중쇄일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 염기 부분, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 펩티드와 같은 다른 부착기, 또는 세포막(예, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA86 : 6553-6556(1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA84 : 648-652 (1987); 1988년 12월 15일에 공개된 PCT 공개 WO 88/09810호) 또는 혈액-뇌 장벽(예, 1988년 4월 25일에 공개된 PCT 공개 WO89/10134호)을 가로지르는 수송을 촉진하는 제제, 하이브리드화-야기된 절단 제제(예, Krol et al., BioTechniques 6: 958-976(1988)) 또는 인터칼레이팅 제제(예, Zon. Pharm. Res. 5: 539-549(1988))를 포함할 수 있다.

[0337] sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산은 대개 올리고뉴클레오티드이며, 일반적으로 단일쇄 DNA 또는 RNA 또는 그 유사체 또는 그 혼합물이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 사람 sHASEGP 폴리펩티드를 암호하는 핵산의 일부에 안티센스인 서열을 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 공지된 치환기를 이용하여 그 구조에서 임의의 위치에서 변형될 수 있다.

[0338] sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-이오도우라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시하이드록시메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실퀘오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀘오신, 5-아포스 -메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 위부톡신, 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-n-2- 카르복시프로필) 우라실, (ACP3)w, 및 2,6-디아미노푸린을 포함하며 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택되는 변형된 염기 부분 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0339] 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일루로스, 및 헥소즈를 포함하며 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택된 변형된 당 모이어티 적어도 하나를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미도티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬 포스포트리에스테르, 및 그 포름아세탈 또는 유사체로부터 선택된 변형된 포스페이트 백본 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0340] 올리고뉴클레오티드는 a-아노머 올리고뉴클레오티드일 수 있다. a-아노머 올리고뉴클레오티드는 쇄들이 서로 평행하는, 상보성 RNA와의 특이적인 이중쇄 하이브리드를 형성한다 (Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641 (1987)).

[0341] 올리고뉴클레오티드는 펩티드; 하이브리드화 야기된 가교제, 수송제제 또는 하이브리드화야기된 절단 제제와 같은 다른 분자에 접합될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 자동화 DNA 합성기(바이오서치, 어플라이드 바이오시스템즈 등에서 시판되는 것들)를 사용하여, 공지된 표준 방법에 의해 합성될 수 있다. 예로써, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 스테인 등의 방법(Nucl. Acids Res. 16: 3209(1988))에 의해 합성될 수 있으며, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오티드는 조절된 기공 유리 중합체 지지체의 사용에 의해 제조될 수 있다 (Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 : 7448-7451 (1988)). 특정 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드

안티센스 올리고뉴클레오티드는 촉매 RNA 또는 리보자임을 포함한다 (예, 1990년 10월 4일에 공개된 PCT 국제 공개 WO90/11364호; Sarver et al., Science 247: 1222- 225 (1990)). 다른 구체예에서는, 올리고뉴클레오티드는 2'-O-메틸리보뉴클레오티드 (Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148 (1987)), 또는 키메라 RNA-DNA 유사체 (Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330(1987))이다.

[0342] 다르게는, 올리고뉴클레오티드는 RNAi와 같은 이중쇄 RNA(dsRNA)일 수 있다.

[0343] 다른 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산은 외인성 서열로부터의 전사에 의해 세포내에서 생산된다.

[0344] 예를 들어, 벡터는 그것이 세포에 의해 섭취되도록 생체내로 도입될 수 있으며, 그 세포내에서 벡터 또는 그 일부가 전사되어 안티센스 핵산(RNA)을 생산한다. 그러한 벡터는 sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산을 암호하는 서열을 함유할 것이다. 그러한 벡터는 그것이 전사되어 원하는 안티센스 RNA를 생산할 수만 있다면, 에피좀으로 남아 있거나 염색체에 통합될 수 있다. 그러한 벡터는 당업계의 표준 재조합 DNA 기법에 의해 구성될 수 있다. 벡터는 포유류 세포에서 복제하고 발현하기 위해 이용되는 플라스미드, 바이러스, 또는 기타일 수 있다. sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 RNA를 암호하는 서열의 발현은 사람을 비롯한 포유류 세포에서 작용하는 것으로 공지된 임의의 프로모터에 의해서일 수 있다. 그러한 프로모터는 유도성 또는 구성형일 수 있다. 그러한 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역(Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310(1981)), 라우스 사코마 바이러스의 3' 긴 말단 반복체에 함유된 프로모터(Yamamoto et al., Ce//22: 787-797(1980)), 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445(1981)), 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열 (Brinster et al., Nature 296: 39-42(1982)) 등을 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0345] 안티센스 핵산은 사람 sHASEGP 폴리펩티드 유전자를 비롯한, sHASEGP 폴리펩티드 유전자의 RNA 전사물의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함한다. 절대적인 상보성이 필요하지는 않다. 종양성 질병의 치료 또는 방지에 효과적인 sHASEGP 폴리펩티드 안티센스 핵산의 양은 질병의 특성에 의존하며, 표준 임상 기법에 의해 실험적으로 결정될 수 있다.

[0346] 가능한 경우, 생체외에서 세포에서, 그리고 이어서 사람에서 시험하고 사용하기에 앞서 유용한 동물 모델 시스템에서 안티센스 세포독성을 결정하는 것이 바람직하다.

[0347] 2. RNA 간섭.

[0348] RNA 간섭(RNAi)(예, Chuang et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4985) 참고)은 sHASEGP를 암호하는 유전자의 발현을 억제하기 위하여 이용될 수 있다. 간섭 RNA(RNAi) 단편, 특히 이중쇄(ds) RNAi는 sHASEGP 기능의 손실을 생성시키기 위하여 이용될 수 있다. 포유류, 씨. 엘레간스(*C. elegans*), 초파리 및 식물 및 사람을 비롯한 유기체에서 유전자를 침묵시키기 위해 RNAi를 사용하는 것에 관련된 방법이 알려져 있다 (예, Fire et al. (1998) Nature 391: 806-811; Fire (1999) Trends Genet. 15: 358-363; Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485-490; Hammond et al.(2001) Nature Rev, Genet. 2: 110-119; Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2:239-245; Hamilton et al. (1999) Science 286 : 950-952; Hammond et al. (2000) Nature 404: 293- 296; Zamore et al. (2000) Cell 101: 25-33; Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15: 188-200; Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-498; 국제 PCT 출원 No. WO01/29058호; 국제 PCT 출원 제WO 99/32619호 참고).

[0349] 이중쇄 RNA(dsRNA)-발현 구조체는 에피좀으로 남아 있거나 게놈내로 통합하는 복제가능한 벡터를 이용하여 동물 또는 식물과 같은 숙주내로 도입된다. 적절한 서열을 선택함으로써, dsRNA의 발현은 sHASEGP를 암호하는 내인성 mRNA의 축적을 방해할 수 있다. RNAi는 또한 생체외에서 발현을 억제하기 위해 이용될 수 있다.

[0350] sHASEGP에 대해 선택적인(즉, 독특한) 적어도 약 21(또는 21) 뉴클레오티드를 포함하는 영역을 이용하여 RNAi를 제조한다. 약 21 뉴클레오티드의 더 작은 단편은 직접(즉, 생체외 또는 생체내) 세포내로 형질전환될 수 있으며; 더큰 RNAi dsRNA 분자는 일반적으로 그들을 암호하는 벡터를 이용하여 도입된다. dsRNA 분자는 적어도 약 21 bp 길이 또는 그 이상이며, 50, 100, 150, 200 이상일 수 있다. 핵산 분자를 생체외 및 생체내에서 세포내로 도입하기 위한 방법, 시약 및 프로토콜은 공지되어 있다.

[0351] 3. 유전자 치료.

[0352] 예시적인 구체예에서, sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 기능성 도메인 또는 유도체를 암호하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 유전자 치료에 의해 sHASEGP 폴리펩티드 기능을 증진시키기 위해 투여된다. 유전자 치료는 대

상에게 핵산을 투여하여 실시되는 치료를 말한다. 이 구체예에서는, 핵산은 sHASEGP 폴리펩티드 기능을 촉진시켜 치료 효과를 매개하는 그 암호 단백질을 생산한다. 당업계에 이용가능한 유전자 치료의 임의의 방법을 이용할 수 있다 (Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3 : 87-95 (1991); Tolstoshev,An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); 및 Morgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH11 5 :155- 215 (1993) 참고). 예를 들어, 유전자 치료를 위한 다른 치료 조성물은 적합한 숙주에서 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 도메인, 단편 또는 키메라 단백질을 발현하는 발현 벡터의 일부인 sHASEGP 폴리펩티드-암호 핵산을 포함한다. 구체적으로, 그러한 핵산은 sHASEGP 폴리펩티드 암호 영역에 작동적으로 연결된 프로모터를 가지며, 상기 프로모터는 유도성 또는 구성형이며, 선택적으로 조직-특이적이다. 다른 특정 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드 암호 서열 및 임의의 다른 원하는 서열이 게놈내의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역과 인접하여 sHASEGP 단백질 핵산이 염색체내 발현되도록 하는 핵산 분자가 이용된다 (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438(1989)).

[0353] 환자내로 핵산의 전달은 직접적일 수 있으며, 이 경우 환자는 핵산 또는 핵산-보유 벡터에 직접 노출되며, 또는 간접적일 수 있으며, 이 경우에는 세포가 먼저 생체외에서 핵산으로 형질전환되고 이어서 환자에게 이식된다. 이들 두 접근법은 각각 생체내 또는 생체외 유전자 치료로 알려져 있다.

[0354] 특정 구체예에서는, 핵산은 생체내로 직접 투여되며, 이 경우 발현되어 암호된 생성물을 생산한다. 이것은 예를 들어, 핵산을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성하고, 예를 들어, 결함이 있거나 약독화된 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 벡터(미국 특허 제4,980,286호)를 이용하여 감염시키거나, 그대로의 DNA를 직접 주사하거나, 또는 미세입자 충격(예, 유전자 총; 바이오리스틱, 듀폰) 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염 제제를 이용한 코팅, 리포좀에의 캡슐화, 미세입자, 또는 미세캡슐을 이용하거나, 또는 핵으로 들어가는 것으로 알려진 펩티드에 그것을 연결시켜 투여하거나, 수용체-매개 식균 작용에 노출되는 리간드에 결합시켜 투여함으로써 세포내로 들어가게 하는 것과 같이(수용체를 특이적으로 발현하는 세포 타입을 표적화하기 위해 이용될 수 있음), 당업자에게 공지된 많은 방법에 의해 이루어질 수 있다 (Wu and Wu, J. Biol. Chem, 262: 4429-4432 (1987)). 다른 구체예에서는, 리간드가 엔도좀을 파괴하기 위한 용해성 바이러스 펩티드여서 핵산이 라이소좀 분해를 피하는 핵산-리간드 복합체가 형성될 수 있다. 또 다른 구체예에서는, 핵산은 특이적 수용체를 표적화시킴에 의해, 세포 특이적 흡수 및 발현을 위해 생체내에서 표적화될 수 있다 (예, 1992년 4월 16일자의 PCT 공개 WO92/06180호(Wu et al.); 1992년 12월 23일자 WO92/22635호(Wilson et al.); 1992년 11월 26일자 WO92/20316호(Findeis et al.); 1993년 7월 22일자 WO93/14188호(Clarke et al.), 1993년 10월 14일자 WO93/20221호(Young) 참고). 다르게는, 핵산은 세포내로 도입되어, 발현을 위해 상동성 재조합에 의해 숙주 세포 DNA내로 통합될 수 있다 (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989); Zijistra et al., Nature 342: 435-438 (1989)).

[0355] 특정 구체예에서, sHASEGP 폴리펩티드 핵산을 함유하는 바이러스 벡터가 이용된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 이용될 수 있다 (Miller et al., Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993) 참고). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 패키징 및 숙주 세포 DNA내로의 통합에 필요하지 않는 레트로바이러스 서열이 결실되도록 변형되었다. 유전자 치료에 이용될 sHASEGP 폴리펩티드 핵산은 벡터내로 클론되어, 유전자가 환자내로 전달되는 것을 촉진한다. 레트로바이러스 벡터에 대한 보다 상세한 사항은 Boesen et al., Biotherapy 6: 291-302 (1994)에 개시되며, 여기서는 줄기 세포를 화학요법에 보다 내성이 되도록 하기 위하여 조혈모 세포에 mdr1 유전자를 전달하기 위해 레트로바이러스 벡터를 사용하는 것을 개시한다.

[0356] 유전자 치료에서 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것을 예시하는 다른 문헌은 Clowes et al., J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); 및 Grossman and Wilson, Curr. Opin. In Genetics And Devel. 3: 110-114 (1993)이다.

[0357] 아데노바이러스는 유전자 치료에 이용될 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위해 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피에 감염되어 온건한 질병을 야기한다. 아데노바이러스-계 전달 시스템을 위한 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 효과를 갖는다. Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993)는 아데노바이러스계 유전자 치료의 개요를 제시한다. Bout et al., Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994)는 붉은털 원숭이의 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위해 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것을 입증하였다. 유전자 치료에서 아데노바이러스를 이용하는 다른 예는 Rosenfeld et al., Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68: 143-155 (1992); 및 Mastrangeli et al., J. Clin.

Invest. 91: 225-234 (1993)에서 발견될 수 있다.

[0358] 아데노-관련 바이러스(AAV) 또한 유전자 치료에서의 사용이 제안되어 왔다 (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993)).

[0359] 유전자 치료에의 다른 접근법은 전기천공, 리포펙션, 칼슘 포스페이트 매개 형질감염, 또는 바이러스 감염과 같은 방법에 의해 조직 배양에서 세포로 유전자를 전달하는 데 관련된다. 대개, 전달 방법은 선택성 마커를 세포로 전달하는 것을 포함한다. 이어서 세포를 선별하여, 전달된 유전자를 흡수하여 발현하는 세포를 분리한다. 이어서 이들 세포를 환자에게 전달한다.

[0360] 이 구체예에서, 핵산은 얻어진 재조합 세포를 생체내로 투여하기에 앞서 세포내로 도입된다. 그러한 도입은 형질감염, 전기천공, 미세주사, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파아지 벡터를 이용한 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 미세세포-매개 유전자 전달, 스페로플라스트 융합 등을 포함하며 이에 한정되지 않는 임의의 공지 방법에 의해 실시될 수 있다. 외래 유전자를 세포내로 도입하기 위해 많은 기법이 공지되어 있으며(예, Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline,Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)), 수용 세포의 필요한 발생학적 및 생리학적 기능이 파괴되지 않는다면 이용될 수 있다. 상기 기법은 세포에 핵산을 안정하게 전달할 수 있게 하여, 핵산은 세포에 의해 발현되고 일반적으로 유전가능하며 그 세포 후손에 의해 발현가능하게 한다.

[0361] 생성된 재조합 세포는 공지된 다양한 방법에 의해 환자에게 전달될 수 있다. 한 구체예에서는, 상피 세포는 예를 들어, 피하로 주사된다. 다른 구체예에서는, 재조합 피부 세포는 환자에게 피부 이식편으로 가해질 수 있다. 재조합 혈액 세포(예, 조혈 모세포 또는 후손 세포)는 정맥내로 투여될 수 있다. 사용을 위한 세포의 양은 원하는 효과, 환자 상태 등에 의존하며, 당업자가 결정할 수 있다.

[0362] 유전자 치료의 목적을 위해 핵산이 도입될 수 있는 세포는 임의의 원하는, 이용가능한 세포 타입을 포함하며, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간세포; T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거대핵세포, 과립구와 같은 혈액 세포; 다양한 줄기 또는 후손 세포, 특히 조혈모세포 또는 후손 세포, 예를 들어 골수, 탯줄 혈액, 말초혈액, 태아 간 및 기타 공급원에서 얻어진 줄기 세포를 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0363] 예를 들어, 유전자 치료에 이용되는 세포는 환자에게 자기유래성이다. 재조합 세포를 유전자 치료에 이용하는 한 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드 핵산이 세포내로 도입되어 세포 또는 그 후손에 의해 발현가능하며, 이어서 재조합 세포는 치료 효과를 위해 생체내로 투여된다. 특정 구체에에서는, 줄기 또는 후손 세포를 이용한다. 생체외에서 분리되고 유지될 수 있는 임의의 줄기 및/또는 후손 세포는 이 구체예에 따라 잠재적으로 이용될 수 있다.

[0364] 그러한 줄기 세포는 조혈모세포(HSC), 피부 및 창자의 내층과 같은 상피 조직의 줄기 세포, 배아 심장 근육 세포, 간 줄기 세포(1994년 4월 28일자 PCT 공개 WO94/08598호), 및 신경 줄기 세포((Stemple and Anderson, Cell 71: 973-985 (1992))를 포함하며 이에 한정되지 않는다.

[0365] 상피 줄기 세포(ESC) 또는 각질세포는 공지 방법에 의해(Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A : 229 (1980)) 피부 및 창자의 내층과 같은 조직으로부터 얻어질 수 있다. 피부와 같은 성층 상피 조직에서, 재생은 기저 라미나에 가장 가까운 층인 종자 층내의 줄기 세포의 유사분열에 의해 일어난다. 창자의 내층내의 줄기 세포는 이 조직의 신속한 재생 속도를 제공한다. 환자 또는 공여자의 피부 또는 창자의 내층으로부터 얻은 ESC 또는 각질세포는 조직 배양으로 성장시킬 수 있다 (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); Pittelkow and Scott, Cano. Clinic Proc. 61: 771 (1986)). 만일 ESC가 공여자에 의해 제공되면, 숙주 대 이식편 반응성의 억제 방법(예, 적당한 면역 억제를 증진하기 위한 조사, 약물 또는 항체 투여) 또한 이용될 수 있다.

[0366] 조혈모세포(HSC)와 관련하여, HSC의 생체외 분리, 증식, 및 유지를 제공하는 임의의 기법을 이 구체예에서 이용할 수 있다. 이것이 이루어질 수 있는 기법은 (a) 미래의 숙주 또는 공여체로부터 분리된 골수 세포로부터 HSC 배양물의 분리 및 확립, 또는 (b) 알러지원 또는 이종원일 수 있는, 이전에 확립된 장기 HSC 배양물의 사용을 포함한다.

[0367] 비-자가 HSC는 대개 미래 숙주/환자의 이식 면역 반응을 억제하는 방법에서 이용된다. 특정 구체예에서, 사람 골수 세포는 주사바늘 흡입에 의해 후방 엉덩뼈능선으로부터 얻어질 수 있다 (예, Kodo et al., J. Clin. Invest. 73:1377-1384 (1984) 참고). 예를 들어, HSC는 매우 풍부하거나 또는 실질적으로 순수한 형태로 만들어질 수 있다. 이러한 농축은 장기 배양전, 배양동안 또는 배양 후 이루어질 수 있으며, 공지의 임의의 기법에 의

해 이루어질 수 있다. 골수 세포의 장기 배양은 예를 들어 변형된 덱스터(Dexter) 세포 배양 기법( Dexter et al., J. Cell Physiol. 91: 335 (1977)) 또는 위트락-위트 배양 기법( Witlock and Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3608-3612 (1982))을 이용하여 확립되고 유지될 수 있다.

[0368] 특정 구체예에서, 유전자 치료의 목적을 위하여 도입될 핵산은 암호 영역에 작동적으로 연결된 유도성 프로모터를 포함하여, 핵산의 발현이 적절한 전사 유도자의 존재 또는 부재를 조절함으로써 조절가능하다.

[0369] 3. 프로드러그

[0370] 종양 치료 방법이 제공된다. 이 방법은 활성 약물 또는 생체내에서 활성 약물로 전환될 수 있는 전구체를 방출하기 위해 HASEGP에 의해 특정 부위에서 절단되는 프로드러그를 투여함으로써 실시된다. sHASEGP 활성을 발현하는 세포와 접촉할 때, 프로드러그는 활성 약물로 전환된다. 프로드러그는 표적화된 sHASEGP를 위한 기질에 연결된, 세포독성 제제와 같은 항-종양 약물 또는 다른 치료제(TA)와 같은 활성 제제를 함유하는 접합체일 수 있으며, 상기 약물 또는 제제는 접합체에서는 비활성이거나 세포로 들어갈 수 없으나, 절단 시 활성화된다. 예를 들어, 프로드러그는 표적화된 sHASEGP에 의해 촉매적으로 절단되는, 상대적으로 짧은, 약 20 이당류 단위 미만인 콘드로이친 설페이트 분자를 함유할 수 있다. 세포독성 제제는 알킬화제, 항증식제 및 튜불린 결합제를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 다른 것들은 빈카 약물, 미토마이신, 블레오마이신 및 탁산을 포함한다.

[0371] **J. 약학 조성물 및 투여 모드**

[0372] 1. 조성물의 성분.

[0373] 활성 sHASEGP를 함유하는 약학 조성물이 여기서 제공된다. sHASEGP 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물의 조합 및 항체 화합물과 같은, 하이알우로니다제 질환의 치료를 위한 화합물 또는 다른 치료가 제공된다.

[0374] sHASEGP 폴리펩티드 및 두번째 제제는 함께 또는 순차적으로 또는 간헐적으로 투여하기 위한 별도의 조성물로 포장될 수 있다. 다르게는, 이들은 투여를 위한 단일 조성물로 제공되거나 또는 단일 조성물로서 투여하기 위한 두 조성물로 제공될 수 있다. 상기 조합은 키트로 포장될 수 있다.

[0375] 2. 제제 및 투여 경로

[0376] 여기서 제공되는 sHASEGP 폴리펩티드 및  그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 대개 단일 투여 형태를 위해 약학 조성물로 조제될 수 있다. 제제에서 상기 폴리펩티드의 농도는 투여시, 목적하는 치료에 효과적인 양을 전달하는 데 효과적이다. 일반적으로, 조성물은 단일 투여량 투여를 위해 조제된다. 조성물을 조제하기 위하여, sHASEGP 폴리펩티드, 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인 또는 그 혼합물의 중량 분획을, 치료되는 상태가 경감되거나 완화되는 유효 농도로, 선택되는 비히클에 용해시키거나, 현탁시키거나, 분산시키거나 또는 다르게는 혼합시킨다.

[0377] 여기서 제공되는 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 투여에 적합한 약학적 담체 또는 비히클은 특정 투여 모드에 적합한 것으로 공지된 임의의 그러한 담체를 포함한다.

[0378] 또한, 폴리펩티드는 조성물내의 유일한 약학적 활성 성분으로 조제되거나 또는 다른 활성 성분과 배합될 수 있다. 조직-표적화 리포좀을 비롯한 리포좀 현탁액 또한 약학적 허용 담체로서 적합할 수 있다. 이들은 공지의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포좀 제제는 미국 특허 제4,522,811호에 개시된 대로 제조될 수 있다.

[0379] 활성 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 치료되는 환자에게 바람직하지 않은 부작용없이 치료적으로 유용한 효과를 나타내기에 충분한 양으로 약학적 허용 담체에 포함된다. 치료적 유효 농도는 여기서 제공된 분석을 이용하거나 하기를 참고하는 것과 같은 공지의 생체외 및 생체내 시스템에서 폴리펩티드를 시험함으로써 실험적으로 결정되고 이어서 그로부터 사람을 위한 투여량을 위해 외삽될 수 있다: Taliani et al. (1996) Anal. Biochem. 240 : 60-67, Filocamo et al. (1997) J Virology 71 : 1417-1427, Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32: 9-18, Buffard et al. (1995) Virology 209 : 52-59, Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem.237 : 239-244, Hamatake et al. (1996) Intervirology 39 : 249-258, Steinkhler et al. (1998) Biochem. 37: 8899-8905, D'Souza et al. (1995) J. Gen. Virol. 76 : 1729-1736, Takeshita et al. (1997) Anal. Biochem. 247 : 242- 246; 또한 예를 들어, Shimizu et al. (1994)J Yirol. 68 : 8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70: 7219-7223, Mizutani et al. (1996)Biochem. Biophys. Res. Commun. 227 : 822-826, Lu et al. (1996) Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) 93 : 1412-1417, Hahm et al. (1996) Virology 226 : 318-326, Ito et al. (1996)J. Gen. Virol. 77: 1043-1054, Mizutani et al. (1995) Biochem.

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

[0380] 일반적으로 치료 유효 투여량이 고려된다. 투여되는 양은 혈액 부피에 대하여 약 0.005-0.05 mg/ml 및 약 0.01 mg/ml를 비롯한 0.001 내지 1 mg/ml의 정도일 수 있다. 약학적 투여 단위 형태는 투여 단위 형태 당 필수 활성 성분 또는 필수 성분의 조합 약 25-75 mg을 비롯한, 약 10 내지 약 500 mg을 비롯하여 약 1mg 내지 약 1000 mg을 제공하도록 제조된다. 정확한 투여량은 실험적으로 결정될 수 있다.

[0381] 일부 경우에는, 사람 sHASEGP의 높은 단위 투여량이 바람직하다. 예를 들어, 500-100,000 유닛 sHASEGP/ml의 sHASEGP 농도의 정맥내 투여가 바람직하다. sHASEGP의 동결건조 제제가 또한 sHASEGP의 큰 유닛 투여량의 저장에 이상적이다. sHASEGP의 200,000 유닛 동결 바이알이 정맥내 전달에 고려된다.

[0382] 고농도 투여량은 또한 작은 부피의 sHASEGP의 전달에 고려된다. 5000 유닛/ml sHASEGP의 10-100 ㎕의 투여는 백내장 및 수정체 안구내 렌즈 이식 수술동안 먼저 투여된 점탄성 물질을 용해시키기 위해 전실에 주사하기 위해 고려된다. 50-200U/ml 투여량의 작은 부피 주사는 또한 당뇨성 망막병증에서 유리체 출혈 또는 유리체-망막 탈착의 치료와 같은 유리체내 수술에 고려된다.

[0383] 활성 성분은 한번에 투여되거나, 또는 일정 간격으로 여러번의 작은 투여량으로 나누어져 투여될 수 있다. 정확한 투여량 및 치료 기간은 치료될 질병에 의존하며, 공지의 시험 프로토콜을 이용하거나 또는 생체내 또는 생체외 시험 데이터로부터 외삽하여 결정될 수 있음이 이해된다. 농도 및 투여량 값은 또한 완화될 상태의 심각성에 따라 변함을 주목한다. 임의의 특정 대상의 경우, 구체적인 투여량 요법은 개별적인 필요 및 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 사람의 전문적 판단에 따라 시간에 따라 조정되어야 하며, 여기서 개시된 농도 범위는 단지 예시일뿐이며 청구된 조성물 및 그들을 함유하는 조합의 범위나 용도를 제한하고자 함이 아님이 이해되어야 한다.

[0384] 약학적 허용 유도체는 산, 염, 에스테르, 수화물, 용매화물 및 프로드러그 형태를 포함한다. 유도체는 일반적으로 그 약동학적 특성이 상응하는 중성 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인보다 우수하도록 선택된다.

[0385] *따라서, 본 발명 폴리펩티드 또는 그 약학적 허용 유도체 하나 이상의 유효 농도 또는 양은 전신, 국소 또는 지역적 투여를 위한 적합한 약학적 담체 또는 비히클과 혼합되어 약학 조성물을 형성한다. sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 치료가 고려되는 질환을 완화시키거나 치료하기 위해 효과적인 양으로 포함된다. 조성물내의 활성 폴리펩티드의 농도는 활성 폴리펩티드의 흡수, 불활성화, 분비 속도, 투여량 스케쥴, 투여되는 양, 특정 제제 및 공지의 다른 인자들에 의존한다.

[0386] 상기 방법에 사용하기 위한 치료제는 국소적, 동맥내, 수조내, 안내, 뇌실내, 경막내, 정맥내, 근육내, 복강내, 진피내, 기관내 및 이들 둘 이상의 조합을 비롯한 공지의 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 건조 분말 폐 제제 또한 이용될 수 있다.

[0387] 가장 적합한 투여 경로는 예를 들어, 유체의 피하 전달을 촉진하기 위한 전달 제제로서의 용도, 점탄성물질을 수용하는 녹내장 환자의 눈에서 안압을 감소시키는 용도, 또는 화학요법제의 활성을 증가시키기 위한 "스프레딩 제제"로서의 용도와 같은 목적 용도, 및 구체적인 내부 기관, 종양 성장, 안내 동공 및 표피와 같은 대상 위치에 따라 달라질 것이다. 투여 모드는 국소적, 지역적, 동맥내, 수조내, 안내, 뇌실내, 경막내, 정맥내, 근육내, 기관내, 복강내, 진피내 및 이들 둘 이상의 조합을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 편평세포 암종, 유방암, 방광암 및 위장관암과 같은 다양한 암의 치료의 경우, 종양 성장 부위에의 투여(예, 경막내, 뇌실내, 또는 수조내)를 비롯한 국소 투여는 치료제의 전신 투여에 수반될 수 있는 합병증의 위험없이 고농도로 치료제가 투여될 수 있는 잇점을 제공한다.

[0388] 여기서 제공되는 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 투여에 적합한 약학적 및 미용적 담체 또는 비히클은 특정 투여 모드에 적합한 것으로 공지된 임의의 그러한 담체를 포함한다. 또한, 상기 폴리펩티드는 조성물내의 유일한 약학적 활성 성분으로 조제되거나 또는 원하는 작용을 손상하지 않는 다른 활성 성분 또는 공지된 원하는 작용을 보충하는 물질과 배합될 수 있다. 예를 들어, 여기서 개시된 sHASEGP 폴리펩티드는 두번째 활성 성분의 전달 촉진 또는 활성 증가를 위하여 약물 또는 프로드러그를 포함하며 이에 한정되지 않는 치료 유효 제제와 같은, 두번째 활성 화합물과 조합되어 전달 또는 "스프레딩" 제제로 이용될 수 있다. 특정 구체예에서는, sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 리그노케인, 부피비케인 또는 이 둘의 혼합물과 같은 마취제, 및 선택적으로 눈 수술동안 혈액 흡수를 감소 또는 중단시키기

위해 에피네프린과 같은 호르몬 제제와 공동 조제될 수 있다. sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 또한 독소 및 종양 괴사 인자와 같은 다양한 화학요법제와 공동조제되어 화학요법제의 활성 및/또는 표적 종양의 화학요법제에의 접근성을 증가시킬 수 있다. 활성 화합물은 치료되는 개체에게 심각한 독성 효과없이 치료적으로 유용한 효과를 나타내기에 충분한 양으로 담체에 포함된다. 유효 농도는 여기서 개시된 동물 모델을 비롯한, 생체외 및 생체내 시스템을 이용하여 화합물을 시험함으로써 실험적으로 결정될 수 있다.

[0389] 비경구, 진피내, 피하, 또는 국소 적용을 위해 이용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분 중 임의의 것을 포함할 수 있다: 주사용 물, 염수 용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글로로 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알콜 및 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 및 소듐 비설파이트와 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 및 포스페이트와 같은 완충액; 및 염화나트륨, 칼슘 클로라이드, 마그네슘 클로라이드, 덱스트로스, 글리세롤 또는 붕산을 비롯한 긴장성의 조절을 위한 제제.

[0390] 비경구 제제는 앰플, 일회용 시린지 또는 유리, 플라스틱 또는 다른 적합한 재료로 만들어진 단일 또는 다중 투여량 바이알에 포함될 수 있다.

[0391] sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 미세화되거나 다른 적합한 형태로 현탁되거나 또는 유도체화되어 보다 가용성인 활성 생성물 또는 프로드러그를 생산할 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 목적하는 투여 모드 및 선택된 담체 또는 비히클에서 폴리펩티드의 가용성을 비롯한 많은 인자에 의존한다. 유효 농도는 표적 상태를 완화시키기에 충분하며 공지의 방법을 이용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 조성물을 조제하기 위하여, 폴리펩티드의 중량 분획은 표적 상태가 경감되거나 완화되는 유효 농도로, 선택 비히클에 용해, 현탁, 분산, 또는 다르게는 혼합된다.

[0392] sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인이 불충분한 가용성을 나타내는 경우, 폴리펩티드를 가용화시키는 방법을 이용할 수 있다. 그러한 방법은 공지되어 있으며, 디메틸설폭시드(DMSO)와 같은 공용매를 이용하거나, TWEEN®

및 Pluronic®

F68과 같은 계면활성제를 이용하거나, 또는 수성 소듐 비카보네이트에 용해시키는 것을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 상기 폴리펩티드의 프로드러그와 같은 유도체는 또한 효과적인 약학 조성물을 조제하는 데 이용될 수 있다. 안과적 사용의 경우, 상기 조성물은 안과적으로 허용가능한 담체에 조제된다. 여기서 안과적 사용의 경우, 국소 투여 또는 주사에 의한 국지적 투여가 고려된다. 서방성 제제 또한 바람직하다. 일반적으로, 조성물은 단일 투여량 투여를 위해 조제되어 단일 투여량이 유효량을 투여하도록 한다.

[0393] 폴리펩티드를 비히클과 혼합 또는 첨가할 때, 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀젼 또는 다른 조성물일 수 있으며, 수성 혼합물, 크림, 젤, 연고, 에멀젼, 용액, 엘릭시르, 로션, 현탁액, 팅크제, 페이스트, 포옴, 에어로졸, 관주, 스프레이, 좌약, 밴드, 또는 전신, 국소 또는 국지 투여를 위해 적합한 임의의 다른 제제로 조제될 수 있다.

[0394] 생성된 혼합물의 형태는 의도한 투여 모드 및 선택된 담체 또는 비히클에서 화합물의 용해도를 비롯한 많은 인자들에 의존한다. 필요하면, 화합물의 약학적 허용 염 또는 다른 유도체가 제조된다. 근육내, 비경구 또는 동맥내 투여와 같은 국소적 내부 투여의 경우, 화합물은 바람직하게는 등장 완충된 염수와 같은 수성계 매질중의 용액 현탁액으로 조제되거나 또는 내부 투여를 위한 생물융화성 지지체 또는 생물접착제와 배합된다.

[0395] sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 치료되는 환자에서 바람직하지 않은 부작용 없이 치료적으로 유용한 효과를 나타내기에 충분한 양으로 약학적 허용 담체에 포함된다. 부작용의 수 및 정도는 화합물이 투여되는 상태에 의존한다. 예를 들어, 보다 덜한 결과의 질환을 치료할 때는 허용되지 않을 일부 독성 및 바람직하지 못한 부작용은 생명을 위협하는 질병을 치료할 때는 허용된다. 치료 용도에 효과적인 양은 물론 질병의 심각성 및 대상의 중량 및 일반적 상태 및 투여 경로에 의존할 것이다. 치료제의 국지적 투여는 일반적으로, 일부 경우에는 치료제의 국소적 농도가, 전신 투여시 안전하게 얻어질 수 있는 것보다 국소 투여 후 더 높을 수 있음에도 불구하고, 전신 투여의 임의 모드보다 더 작은 투여량을 필요로 한다.

[0396] 개별 대상이 증상의 심각성에서 큰 차이를 나타내며 각 치료제가 그 독특한 치료 특성을 가질 수 있으므로, 치료에 대한 대상의 반응을 결정하고 이에 따라 투여량을 변화시키는 것은 의사에게 달려 있다. 생체외에서 사용

되는 투여량은 약학 조성물의 인시추 투여에 유용한 양의 유용한 안내를 제공할 수 있으며, 동물 모델은 일부 경우에는 특정 질환의 치료를 위한 유효 투여량을 결정하기 위해 이용될 수 있다. 하지만, 일반적으로, 국지적 투여의 경우, 치료제의 유효량은 체중 kg 당 약 0.1 피코그램(pg) 내지 약 1 ng 범위내의 양일 것이다. 유효량을 얻는 데 있어서 다양한 고려 사항이 공지되어 있으며 개시된다 (예, Goodman And Gilman's : The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press,1990; Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; 및 Mantyh et al., Science,278 : 275-79,1997(신경 특이적 리간드-독소의 경막내 주사에 관련되며 모두 참고로 전체가 본원에 통합됨)).

[0397] 여기서 사용하기 위한 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 제제는 경구, 직장, 국소, 흡입, 볼내(예, 혀밑), 비경구(예, 피하, 근육내, 진피내, 또는 정맥내), 경피 투여 또는 임의의 경로에 적합한 것들을 포함한다. 임의의 주어진 경우에서 가장 적합한 경로는 치료될 상태의 특성 및 심각도 및 사용될 특정 활성 화합물의 특성에 의존한다. 상기 제제는 적합한 양의 폴리펩티드 및/또는 다른 제제 또는 그 약학적 허용 유도체를 함유하는 정제, 캡슐, 알약, 분말, 과립, 멸균 비경구 용액 또는 현탁액, 및 경구 용액 또는 현탁액, 및 오일-물 에멀젼과 같은 단위 제형으로 사람 및 동물에게 투여하도록 제공된다. 약학적 치료적 활성 폴리펩티드 및/또는 다른 제제 및 그 유도체는 일반적으로 단위 제형 또는 다중 제형으로 조제되고 투여된다. 본원에서 사용된 것으로서 단위 투여량 형태는 사람 및 동물에 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며 공지된 대로 개별적으로 포장된다.

[0398] 약학 조성물은 적합한 양의 sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인, 및 선택적으로 다른 제제 또는 그 약학적 허용 유도체를 함유하는 정제, 캡슐, 알약, 분말, 과립, 멸균 비경구 용액 또는 현탁액, 및 경구 용액 또는 현탁액, 및 오일-물 에멀젼과 같은 단위 제형으로 사람 및 동물에게 투여하도록 제공된다. 약학적 치료적 활성 화합물 및 그 유도체는 일반적으로 단위 제형 또는 다중 제형으로 조제되고 투여된다. 본원에서 사용된 것으로서 단위-투여량 형태는 사람 및 동물에 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 말하며 공지된 대로 개별적으로 포장된다. 각 단위-투여량은 필요한 약학적 담체, 비히클 또는 희석제와 함께, 원하는 치료 효과를 생산하기에 충분한 미리 정해진 양의 치료 활성 화합물을 함유한다. 단위-투여량 형태의 예는 앰플, 시린지 및 개별 포장된 정제 또는 캡슐을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 5 내지 50 ㎕와 같은 작은 부피내에 1 내지 5000 유닛의 sHASEGP를 갖는 안정화된 용액을 함유하는 작은 부피 제제는 점탄성 주사 후와 같은 용도를 위해 시린지에 포장될 수 있다. 단위-투여량 형태는 분획으로 또는 여러번 투여할 수 있다. 다중-투여량 형태는 분리된 단위-투여량 형태로 투여되기 위해 단일 용기에 포장된 다수의 동일한 단위-투여량 형태이다. 다중-투여량 형태의 예는 바이알, 정제 또는 캡슐 병 또는 파인트 또는 갤론 병을 포함한다. 따라서, 다중 투여량 형태는 포장에서 분리되지 않은 다수의 단위 투여량이다.

[0399] 상기 조성물은 sHASEGP 폴리펩티드와 같은 활성 성분과 함께, 락토스, 수크로스, 디칼슘 포스페이트 또는 카르복시메틸셀룰로스와 같은 희석제; 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트 및 활석과 같은 활택제; 및 전분, 고무 아카시아젤라틴과 같은 천연 고무, 글루코스, 당밀, 폴리비닐피롤리딘, 셀룰로스 및 그 유도체, 포비돈, 크로스포비돈 및 공지된 기타 그러한 결합제와 같은 결합제를 함유할 수 있다. 액체 약학적 투여형 조성물은 예를 들어, 전술한 활성 화합물 및 선택적인 약학적 아쥬반트를 예를 들어, 물, 염수, 수성 덱스트로스, 글리세롤, 글리콜, 에탄올, 등과 같은 담체에 용해, 분산, 또는 다르게는 혼합시킴으로써 용액 또는 현탁액을 형성하여 제조될 수 있다. 필요하면, 투여될 약학 조성물은 또한 습윤제, 유화제, 또는 가용화제, pH 완충제 등, 예를 들어, 아세테이트, 소듐 시트레이트, 시클로덱스트린 유도체, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 소듐 아세테이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 및 기타 그러한 제제와 같은 비독성 보조 물질 소량을 함유할 수 있다. 그러한 제형을 제조하는 방법은 공지되어 있거나 당업자에게 명백할 것이다 (예, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa.,15th Edition, 1975). 투여될 조성물 또는 제제는 치료되는 대상의 증상을 완화시키기에 충분한 양으로 활성 화합물을 함유한다. 예를 들어, 여기서 제공된 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 표준 안정화 제제는 EDTA, NaCl 및 $CaCl_2$에 조제된 150 U/ml의 가용성 당단백질을 포함한다. 부가적으로, 티오메르살을 비제한적으로 포함하는 항균 또는 항진균제가 제제에 존재할 수 있다. 여기서 제공되는 다른 제제는 150 Unit/ml과 같은 유효량의 가용성 당단백질을 13 mg/ml과 같은 락토스와 함께 함유하는, EDTA, NaCl 및 $CaCl_2$ 중의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 안정화 용액 또는 동결 건조 형태이다. 150 Unit/ml과 같은 유효량의 가용성 당단백질을 13 mg/ml과 같은 락토스, 및 알부민, Pluronic® F68, TWEEN®

및/또는 기타 세제와 함께 함유하는, EDTA, NaCl 및 $CaCl_2$ 중의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 안정화 용액 또는 동결 건조 형태를 함유하는 제제 또한 여기서 제공된다. 동결건조 또는 안정화 용액으로서 여기서 제공되는 다른 제제는 EDTA, NaCl 및 $CaCl_2$ 중의, 1 내지 300 Unit/ml과 같은, sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 유효량을 함유한다.

[0400] 비독성 담체로 구성되는 나머지와 함께 0.005% 내지 100%의 범위로 활성 성분을 함유하는 제형 또는 조성물이 제조될 수 있다. 경구 투여를 위하여, 약학 조성물은 예를 들어, 결합제(예, 예비젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 칼슘 수소 포스페이트); 활택제(예, 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제(예, 감자 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예, 소듐 라우릴 설페이트)와 같은 약학적 허용 부형제를 이용하여 종래의 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐 형태를 취할 수 있다. 정제는 공지의 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0401] sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인 또는 약학적 허용 유도체는 서방성 제제 또는 코팅과 같은, 가용성 당단백질이 신체로부터 신속하게 제거되지 않도록 하는 담체를 이용하여 제조될 수 있다. 상기 조성물은 원하는 특성의 조합을 얻기 위하여, 화학요법제, 진통제, 항염증제, 항균제, 아메바살균제, 트리코모나스 제거제, 항-파킨슨제, 항-말라리아제, 항경련제, 항우울제, 및 항관절염제, 항진균제, 항고혈압제, 해열제, 항기생충제, 항히스타민제, 알파-아드레날린 아고니스트제, 알파 차단제, 마취제, 기관지 확장제, 살생물제, 살균제, 세균발육저지제, 베타아드레날린 차단제, 칼슘 채널 차단제, 심혈관 약물제, 피임제, 충혈제거제, 이뇨제, 억제제, 진단제, 전해질제, 수면제, 호르몬제, 고혈당제, 근육 이완제, 근육 수축제, 안과 제제, 부교감신경흥분 작용제, 정신 활력제, 안과용제제, 진정제, 교감신경흥분 작용제, 신경안정제, 비뇨제, 질 제, 바이러스실멸제, 비타민제, 비스테로이드 항염증제, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 약물, 프로드러그, 유기 분자 및 수면 유도제를 포함하며 이에 한정되지 않는, 질병 또는 의학 상태 하나 이상을 치료하는데 가치있는 공지된 다른 약학적 유효제제를 포함할 수 있다. 그러한 조합 치료는 여기서 제공되는 조성물 및 치료 방법의 추가의 태양을 구성함이 이해되어야 한다.

[0402] 1. 경구 투여용 조성물

[0403] 경구 약학 제형은 고체, 젤 또는 액체이다. 고체 제형은 정제, 캡슐, 과립, 및 덩어리 분말이다. 경구 정제의 타입은 압착, 씹을 수 있는 로젠지 및 정제를 포함하며, 이들은 장용코팅되거나, 당 코팅되거나 또는 필름 코팅될 수 있다. 캡슐은 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐일 수 있으며, 과립 및 분말은 공지된 다른 성분과 조합되어 비-비등성 또는 비등성 형태로 제공될 수 있다.

[0404] sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 약학 조성물은 액체 형태, 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액이거나, 또는 사용전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 재구성하기 위한 약물 생성물로 제공될 수 있다. 그러한 액체 제제는 현탁제(예, 솔비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예, 레시틴 또는 아카시아); 비수용성 비히클(예, 아몬드 오일, 유성 에스테르, 또는 분획화 식물성 오일); 및 방부제(예, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 솔브산)과 같은 약학적 허용 첨가제를 이용하여 종래의 수단에 의해 제조될 수 있다.

[0405] 일부 구체예에서는, 제제는 고형 제형이며, 바람직하게는 캡슐 또는 정제이다. 정제, 알약, 캡슐, 트로치 등은 결합제, 희석제, 붕해제, 활택제, 글리단트, 감미제 및 향미제중 임의의 것 또는 유사한 특성의 화합물을 함유할 수 있다.

[0406] 결합제의 예는 미세결정질 셀룰로스, 고무 트라가칸트, 글루코스 용액, 아카시아 고무풀, 젤라틴 용액, 수크로스 및 전분 페이스트를 포함한다. 활택제는 활석, 전분, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 리코포듐 및 스테아르산을 포함한다. 희석제는 예를 들어, 락토스, 수크로스, 전분, 카올린, 염, 만니톨 및 디칼슘 포스페이트를 포함한다. 글리단트는 콜리이드 실리콘 디옥사이드를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 붕해제는 크로스카르멜로스 소듐, 소듐 전분 글리콜레이트, 알긴산, 옥수수 전분, 감자 전분, 벤토나이트, 메틸셀룰로스, 한천 및 카르복시메틸셀룰로스를 포함한다. 착색제는 예를 들어, 승인되고 확인된 수용성 FD 및 C 염료, 그 혼합물; 및 알루미나 수화물에 현탁된 수불용성 FD 및 C 염료를 포함한다. 감미제는 수크로스, 락토스, 만니톨 및 사카린과 같은 인공 감미제 및 임의의 수의 분무 건조된 향료를 포함한다. 향미제는 과일과 같은 식물에서 추출한 천연 향 및 페퍼민트 및 메틸 살리실레이트와 같은 상쾌한 감각을 생산하는 합성 화합물 혼합물을 포함한다. 습윤제는 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 솔비탄 모노올레이트, 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌 라우르 에테르를 포함한다. 구토를 일으키는 코팅은 지방산, 지방, 왁스, 셸락, 암모니아화된 셸락 및 셀룰로스

아세테이트 프탈레이트를 포함한다. 필름 코팅은 하이드록시에틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜 4000 및 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트를 포함한다.

[0407] 만일 경구 투여가 필요하면, sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 그것을 위의 산성 환경으로부터 보호하는 조성물로 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 위에서 그 통합성을 유지하고 장에서 활성 화합물을 방출하는 장용 코팅내에 조제될 수 있다. 상기 조성물은 또한 개미산 또는 다른 그러한 성분과 함께 조제될 수 있다.

[0408] 투여량 단위 형태가 캡슐인 경우, 이것은 상기 타입의 물질에 더하여, 지방 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 또한, 투여량 단위 형태는 투여량 단위의 물리적 형태를 변형시키는 다양한 다른 물질, 예를 들어, 당 및 다른 장용 제제의 코팅을 함유할 수 있다. 상기 화합물은 또한 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼, 스프링클, 츄잉검 등의 성분으로 투여될 수 있다. 시럽은 활성 화합물에 더하여, 감미제로서 수크로스 및 일부 방부제, 염료 및 착색제 및 향료를 함유할 수 있다.

[0409] sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인은 또한 원하는 작용을 손상시키지 않는 다른 활성 물질, 또는 개미산, H2 차단제, 및 이뇨제와 같은 원하는 작용을 보충하는 물질과 혼합될 수 있다. 활성 성분은 여기서 개시된 대로 화합물 또는 그 약학적 허용 유도체이다. 최대 약 98 중량%의 고 농도의 활성 성분이 포함될 수 있다.

[0410] 정제에 포함되는 약학적 허용 담체는 결합제, 활택제, 희석제, 붕해제, 착색제, 향미제, 및 습윤제이다. 장용 코팅때문에, 장용코팅된 정제는 위산의 작용에 저항하며 중성 또는 알카리성 장에서 용해 또는 붕해된다. 당코팅된 정제는 약학적 허용 물질의 다른 층들이 적용되는 압착 정제이다. 필름-코팅된 정제는 중합체 또는 다른 적합한 코팅으로 코팅된 압착 정제이다. 다중 압착 정제는 이전에 언급된 약학적 허용 물질을 이용하는 2회 이상의 압착 사이클에 의해 만들어진 압착 정제이다. 착색제는 또한 상기 투여량 형태에 이용될 수 있다. 향미제 및 감미제는 압착 정제, 당 코팅되고, 다중 압착되고 씹을 수 있는 정제로 이용된다. 향미제 및 감미제는 씹을 수 있는 정제 및 로젠지의 형성에 특히 유용하다.

[0411] 액체 경구 제형은 수용액, 에멀젼, 현탁액, 비비등성 과립으로부터 재구성된 용액 및/또는 현탁액 및 비등성 과립으로부터 재구성된 비등성 제제를 포함한다. 수용액은 예를 들어, 엘릭시르 및 시럽을 포함한다. 에멀젼은 수중유 또는 유중수이다.

[0412] 엘릭시르는 투명하고, 감미된, 하이드로알콜성 제제이다. 엘릭시르에 사용되는 약학적 허용 담체는 용매를 포함한다. 시럽은 당, 예를 들어, 수크로스의 농축된 수용액이며, 방부제를 함유할 수 있다. 에멀젼은 한 액체가 다른 액체에 작은 방울 형태로 분산된 2-상 시스템이다. 에멀젼에 이용되는 약학적 허용 담체는 비수성 액체, 유화제 및 방부제이다. 현탁액은 약학적 허용 현탁제 및 방부제를 이용한다. 액체 경구 제형으로 재구성될, 비등방성 과립에 이용되는 약학적 허용 물질은 희석제, 감미제 및 습윤제를 포함한다. 액체 경구 제형으로 재구성될, 등방성 과립에 사용되는 약학적 허용 물질은 유기산 및 이산화탄소 공급원을 포함한다. 착색제 및 향미제가 상기 모든 제형에서 이용된다.

[0413] 용매는 글리세린, 솔비톨, 에틸 알콜 및 시럽을 포함한다. 방부제의 예는 글리세린, 메틸 및 프로필파라벤, 벤조산, 소듐 벤조에이트 및 알콜을 포함한다. 에멀젼에 이용되는 비수성 액체의 예는 미네럴 오일 및 목화씨 오일을 포함한다. 유화제의 예는 젤라틴, 아카시아, 트라가칸트, 벤토나이트, 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트와 같은 계면활성제를 포함한다. 현탁제는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 펙틴, 트라가칸트, 비굼(veegum) 및 아카시아를 포함한다. 희석제는 락토스와 수크로스를 포함한다. 감미제는 수크로스, 시럽, 글리세린 및 사카린과 같은 인공 감미제를 포함한다. 습윤제는 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 솔비탄 모노올레이트, 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르를 포함한다. 유기 첨가제는 시트르산 및 타르타르산을 포함한다. 이산화탄소의 공급원은 소듐 비카보네이트 및 소듐 카보네이트를 포함한다. 착색제는 승인된 확인 수용성 FD 및 C 염료, 및 그 혼합물 중 임의의 것을 포함한다. 향미제는 과일과 같은 식물로부터 추출된 천연 향료, 및 상쾌한 미각을 생산하는 화합물의 합성 혼합물을 포함한다.

[0414] 고형 제형의 경우, 예를 들어 프로필렌 카보네이트, 식물성 오일 또는 트리글리세라이드 중의 용액 또는 현탁액은 젤라틴 캡슐에 캡슐화된다. 그러한 용액, 및 그 제제 및 캡슐화는 미국 특허 제4,328,245호, 4,409,239호, 및 4,410,545호에 개시된다. 액체 제형의 경우, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 중의 용액은 충분한 양의 약학적 허용 액체 담체, 예, 물로 희석되어 투여를 위해 쉽게 측정될 수 있다.

[0415] 다르게는, 액체 또는 반고체 경구 제제는 식물성 오일, 글리콜, 트리글리세라이드, 프로필렌 글리콜 에스테르

(예, 프로필렌 카보네이트) 및 기타 그러한 담체에 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 용해 또는 분산시키고, 이들 용액 또는 현탁액을 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐 쉘에 캡슐화시켜 제조될 수 있다. 다른 유용한 제제는 미국 특허 Re 28,829호 및 4,358,603호에 개시된 것들을 포함한다.

[0416] 볼내(혀밑) 투여에 적합한 제제는 예를 들어, 대개 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트인 향미 기제중에 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 로젠지; 및 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 불활성 기제중에 상기 화합물을 함유하는 파스틸을 포함한다.

[0417] 모든 구체예에서, 정제 및 캡슐 제제는 활성 성분의 용해를 변화시키거나 지속하기 위해 공지된 대로 코팅될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 이들은 페닐살리실레이트, 왁스 및 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트와 같은 종래의 장내 소화형 코팅으로 코팅될 수 있다.

[0418] 2. 주사제, 용액 및 에멀젼

[0419] 피하, 근육내 또는 정맥내 주사를 특징으로 하는, sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 비경구 투여 또한 여기서 고려된다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액; 주사 전에 액체에 용해시키거나 현탁시키기에 적합한 고체 형태 또는 에멀젼으로서, 종래의 형태로 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 덱스트로스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 또한, 필요하면, 투여될 약학 조성물은 또한 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증가제, 및 예를 들어, 소듐 아세테이트, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 및 시클로덱스트린과 같은 기타 그러한 제제와 같은 비독성 보조 물질 소량을 함유할 수 있다. 서방성 또는 지속성 방출 시스템의 이식에 의해 일정한 수준의 투여량이 유지되도록 하는 것(예, 미국 특허 제3,710,795호 참고) 또한 여기서 고려된다. 그러한 비경구 조성물에 함유된 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 퍼센티지는 그 구체적인 특성, 및 화합물의 활성 및 대상의 필요에 의존한다.

[0420] 조성물의 비경구 투여는 정맥내, 피하 및 근육내 투여를 포함한다. 비경구 투여용 제제는 멸균 주사용 용액, 피하 주사용 정제를 비롯한, 사용 전에 용매 또는 멸균용액과 배합될, 동결 건조 분말과 같은 멸균 건조 가용성 생성물, 및 주사용 멸균 현탁액, 사용 전에 비히클과 배합될 멸균 건조 불용성 생성물 및 멸균 에멀젼을 포함한다. 상기 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0421] 정맥내로 투여된다면, 적합한 담체는 생리학적 염수 또는 포스페이트 완충된 염수(PBS), 및 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜 및 그 혼합물과 같은 농후제 및 가용화제를 함유하는 용액을 포함한다.

[0422] 비경구 제제에 이용되는 약학적 허용 담체는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 완충액, 항산화제, 국소 마취제, 현탁 및 분산제, 유화제, 격리 또는 킬레이팅 제 및 다른 약학적 허용 물질을 포함한다.

[0423] 수성 비히클의 예는 염화나트륨 주사제, 링거 주사제, 등장 덱스트로즈 주사제, 멸균수 주사제, 덱스트로스 및 락테이트화 링거 주사제를 포함한다. 비수성 비경구 비히클은 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일 및 땅콩 오일을 포함한다. 페놀 또는 크레졸, 수은제, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티오메르살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤즈에토늄 클로라이드를 포함하는 세균성장저해 또는 진균성장저해 농도의 항균제가 다중 투여량 용기에 포장된 비경구 제제에 첨가되어야 한다. 등장제제는 염화나트륨 및 덱스트로스를 포함한다. 완충액은 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 항산화제는 소듐 비설페이트를 포함한다. 국소 마취제는 프로케인 하이드로클로라이드를 포함한다. 현탁제 및 분산제는 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리솔베이트 80(TWEEN® 80)을 포함한다. 금속 이온의 격리제 또는 킬레이팅제는 EDTA를 포함한다. 약학적 담체는 또한 물 혼화성 비히클을 위해 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을, 그리고 pH 조절을 위해 소듐 하이드록사이드, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함한다.

[0424] 약학적 활성 화합물의 농도는 주사가 원하는 약리 효과를 생산하기에 충분한 양을 제공하도록 조절된다. 정확한 투여량은 환자 또는 동물의 연령, 중량 및 상태에 의존한다.

[0425] 단위-투여량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 주사바늘을 갖춘 시린지에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 공지된 대로, 멸균되어야 한다.

[0426] 예시적으로, 활성 화합물을 함유하는 멸균 수용액의 정맥내 또는 동맥내 주입이 효과적인 투여 모드이다. 다른 구체예는 원하는 약리 효과를 생산하기 위해 필요에 따라 주사되는 활성 물질을 함유하는 멸균 수성 또는 유성

용액 또는 현탁액이다.

[0427] 주사제는 국소 및 전신 투여를 위해 고안된다. 일반적으로 치료적 유효 투여량은 치료되는 조직에 대해 적어도 약 0.1% w/w 내지 약 90% w/w 또는 그 이상, 바람직하게는 1% w/w 초과의 활성 화합물의 농도를 함유하도록 조제된다. sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인과 같은 활성 성분은 한번에 투여되거나, 또는 일정 간격으로 투여될 여러 개의 작은 투여량으로 나누어질 수 있다. 정확한 투여량 및 치료 기간은 치료될 조직에 따라 결정되며, 공지의 시험 프로토콜을 이용하거나 또는 생체내 또는 생체외 시험 데이터로부터의 외삽에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 농도 및 투여량 값은 또한 치료될 개체의 연령에 따라 변할 수 있음이 주목된다. 임의의 특정 대상의 경우, 특정 투여량 요법은 개별 필요 및 제제를 투여하고 제제의 투여를 감독하는 전문가의 판단에 따라 시간에 따라 조절되며, 여기서 개시된 농도 범위는 단지 예시적인 것이며 청구된 제제의 범위 또는 실시를 제한하지 않는다.

[0428] 여기서 제공된 화합물은 주사에 의해, 예를 들어, 환괴 주사 또는 연속 주입에 의해 비경구 투여되기 위해 조제될 수 있다. 주사용 제제는 첨가된 방부제와 함께 단위 제형, 예를 들어, 앰퓰 또는 다중-투여량 용기에 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클중의 현탁액, 용액 또는 에멀젼일 수 있으며, 현탁, 안정화 및/또는 분산제와 같은 조제 제제를 함유할 수 있다. 다르게는, 활성 성분은 적절한 비히클, 예를 들어 멸균 무-피로젠 물 또는 다른 용매를 이용하여 사용 전에 재구성하기 위한 분말 형태일 수 있다. 예를 들어, 안정화된 용액 또는 동결건조 형태내에 500 내지 500,000 유닛과 같은 유효량의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 비경구 제제가 여기서 제공된다.

[0429] 상기 화합물은 미세화된 형태 또는 다른 적합한 형태로 현탁되거나, 또는 유도체화되어 보다 가용성인 활성 생성물을 생산하거나 프로드러그를 생산할 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 투여 모드 및 선택 담체 또는 비히클에서 상기 화합물의 용해도를 비롯한 많은 인자에 의존한다. 유효 농도는 상태의 증상을 완화시키기에 충분하며 실험적으로 결정될 수 있다.

[0430] 3. 동결건조된 분말

[0431] 용액, 에멀젼 및 기타 혼합물로 투여하기 위해 재구성될 수 있는 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 동결건조된 분말이 여기서 제공된다. 이들 제제는 또한 고체 또는 젤로서 재구성되고 조제될 수 있다.

[0432] 멸균, 동결건조 분말은 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 용액의 고체 부분을 적합한 용매에 용해시키거나 상기 용액의 분액을 적합한 용매에 혼합함으로써 제조된다. 상기 용매는 분말 또는 상기 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 성분을 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 이용될 수 있는 부형제는 덱스트로즈, 솔비톨, 프럭토스, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스, 락토스 또는 기타 적합한 제제를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 상기 용매는 또한 시트레이트, 소듐 또는 포타슘 포스페이트 또는 약 중성 pH의 기타 그러한 공지의 완충액과 같은 완충액을 함유할 수 있다. 이어서 상기 용액의 멸균 여과 및 공지된 표준 조건하에서의 동결건조는 동결건조된 제제를 제공한다. 일반적으로, 멸균 여과로부터 생기는 용액은 동결건조를 위해 바이알로 나눠진다. 각 바이알은 10-1000 mg 또는 100-500 mg과 같은 단일 투여량, 또는 다중 투여량의 화합물을 함유할 수 있다.

[0433] 요약하면, 동결건조 분말은 덱스트로스, 솔비톨, 프럭토스, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스, 락토스 또는 기타 적합한 제제 약 1-20%를 시트레이트, 소듐 또는 포타슘 포스페이트 또는 약 중성 pH의 공지된 기타 그러한 완충액과 같은 적합한 완충액에 용해시켜 제조된다. 이어서, 예를 들어 sHASEGP의 소듐 염(완충 용액 10-100 그램 당 약 1 그램의 염, 대개 약 1 gm/30 gm)과 같은 선택된 염이 약 30-35 ℃와 같은 실온 이상에서 생성된 혼합물에 첨가되며, 용해될 때까지 교반된다. 생성된 혼합물은 약 10-50%, 일반적으로 약 15-25% 정도만큼 염의 생성 농도를 감소시키기 위해, 더 많은 완충액을 첨가함으로써 희석된다. 생성된 혼합물은 입자를 제거하고 멸균성을 보장하기 위하여 멸균 여과 또는 처리되며, 동결건조를 위해 바이알에 나눠진다. 동결건조 분말은 약 4 ℃ 내지 실온과 같은 적절한 조건하에서 저장될 수 있다.

[0434] 주사용 물을 이용하여 상기 동결건조 분말을 재구성하면 비경구 투여에 사용하기 위한 제제가 얻어진다. 재구성의 경우, sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 동결건조 분말의 치료적 유효량을 멸균수 또는 다른 적합한 담체 밀리리터당 첨가한다. 정확한 양은 선택된 화합물에 의존하며 공지 방법으로 실험적으로 결정할 수 있다.

[0435] 4. 국소 투여

[0436] 국소 혼합물은 국소 및 전신 투여를 위해 개시된 대로 제조된다. 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀젼 등일 수 있으며 크림, 젤, 연고, 에멀젼, 용액, 엘릭시르, 로션, 현탁액, 팅크제, 페이스트, 포옴, 에어로졸, 관주, 분무, 좌약, 밴드, 피부 패치 또는 국소 투여에 적합한 임의의 다른 제제로서 조제된다.

[0437] sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인 또는 그 약학적 허용 유도체의 조성물은 흡입에 의해서와 같이, 국소 적용하기 위한 에어로졸로서 조제될 수 있다 (예, 미국 특허 제 4,044,126호, 4,414,209호, 및 4,364,923호 참고하며, 이들은 염증성 질병, 특히 천식 치료에 유용한 스테로이드의 전달을 위한 에어로졸을 개시함). 호흡기에 투여하기 위한 이들 제제는 락토스와 같은 불활성 담체와 조합된, 에어로졸 또는 분무기를 위한 용액 형태이거나, 또는 팽대를 위한 미세분말일 수 있다. 그러한 경우에, 제제의 입자는 대개 50 미크론 미만, 예를 들어, 10 미크론 미만의 직경을 가질 것이다.

[0438] 흡입에 의한 투여의 경우, 여기서 사용하기 위한 조성물은 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 및 기타 적합한 가스를 포함하며 이에 한정되지 않는 적합한 추진제를 사용하여, 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 형태로 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한, 예를 들어, 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말기제의 분말 혼합물을 함유하도록 조제될 수 있다.

[0439] 상기 조성물은 젤, 크림 및 로션의 형태로, 눈과 같은 점막 및 피부에 국소 적용, 그리고 눈에의 적용 또는 수조내 또는 척추관안 적용과 같은 국지 또는 국소 적용을 위해 조제될 수 있다. 국소 투여는 경피 전달 및 눈 또는 점막에의 투여, 또는 흡입 치료를 위해 고려된다. 활성 화합물 단독 또는 다른 약학적 허용 부형제와의 조합의 비강 용액 또한 투여될 수 있다.

[0440] 예를 들어, 피부 또는 눈에의 국소 적용에 적합한 제제는 연고, 크림, 로션, 페이스트, 젤, 스프레이, 에어로졸 및 오일로 조제된다. 이용될 수 있는 담체는 바세린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 알콜, 및 이들 둘 이상의 조합을 포함한다. 국소 제제는 추가로 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알콜, 폴리(알킬렌 글리콜), 폴리/하이드록시알킬, (메트)아크릴레이트 또는 폴리(메트)아크릴아미드를 포함하며 이에 한정되지 않는, 0.05 내지 15 중량%의 농후제를 함유할 수 있다. 국소 제제는 종종 적하에 의해 또는 연고로서 결막주머니내로 적용된다. 이것은 또한 눈, 얼굴 공동, 및 외이도의 관주 또는 윤활을 위해 이용될 수 있다. 액체 상태의 국소 제제는 또한 스트립, 콘택트 렌즈 등의 형태의 친수성 삼차원 중합체 매트릭스에 존재할 수 있으며 이로부터 활성 성분이 방출된다. 이것은 또한 앞쪽 안실 및 다른 장소내로 주사될 수 있다. 예를 들어, 30 내지 150,000 Units/mg의 비활성을 갖는 가용성 당단백질 1 내지 5000 유닛과 같은, 유효량의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인의 안정화 용액을 5 내지 50 ㎕와 같은 작은 부피에 함유하는 제제가 점탄성 주사 후 안내 사용을 위해 제공된다.

[0441] 이들 용액, 특히 안과적 사용을 목적으로 하는 것들은 적절한 염과 함께, 약 5-7 pH의 0.01% - 10% 등장 용액으로 조제될 수 있다.

[0442] 5. 다른 투여 경로를 위한 조성물

[0443] 국소 적용, 경피 패치, 및 직장 투여와 같은 다른 투여 경로 또한 여기서 고려된다.

[0444] 예를 들어, 직장 투여를 위한 약학적 제형은 전신 효과를 위한 직장 좌약, 캡슐 및 정제이다. 본원에서 사용된 것으로서 직장 좌약은 직장 내로 삽입하기 위한 고체 덩어리로서 체온에서 용융하거나 연화되어 하나 이상의 약학적 또는 치료학적 활성 성분을 방출한다. 직장 좌약에 이용되는 약학적 허용 물질은 기제 또는 비히클 및 융점을 상승시키기 위한 제제이다. 기제의 예는 코코아 버터(테오브로마 오일), 글리세린-젤라틴, 카보왁스(폴리옥시에틸렌 글리콜) 및 지방산의 모노-, 디- 및 트리글리세리드의 적절한 혼합물을 포함한다. 다양한 기제의 조합을 이용할 수 있다. 좌약의 융점을 상승시키기 위한 제제는 경랍 및 밀랍을 포함한다. 직장 좌약은 압착법 또는 주형법에 의해 제조될 수 있다. 직장 좌약의 전형적인 중량은 약 2 내지 3 gm이다.

[0445] 직장 투여를 위한 정제 및 캡슐은 경구 투여용 제제와 동일한 약학적 허용 물질 및 동일한 방법을 이용하여 제조된다.

[0446] 경피 투여에 적합한 제제는 지속적인 기간동안 수용체의 표피와 밀접하게 접촉하도록 적응된 별도의 패치로 제공될 수 있다. 그러한 패치는 예를 들어, 활성 화합물에 대하여 0.1 내지 0.2M 농도의 선택적으로 완충된 수용액으로서 활성 화합물을 함유한다. 경피 투여에 적합한 제제는 또한 전리요법(예, Pharmaceutical Research 3

(6) : 318 (1986))에 의해 전달될 수 있으며, 일반적으로 활성 화합물의 선택적으로 완충된 수용액 형태를 갖는다.

[0447] 약학 조성물은 또한 조절된 방출 수단 및/또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다 (예, 미국 특허 제3,536,809호; 제3,598,123호; 제3,630,200호; 제3,845,770호; 제3,847,770호; 제3,916,899호; 제4,008,719호; 제4,687,610호; 제4,769,027호; 제5,059,595호; 제5,073,543호; 제5,120,548호; 제5,354,566호; 제5,591, 767호; 제5,639,476호; 제5,674,533호 및 제5,733,566호 참고). 활성 화합물 또는 약학적 허용 유도체는 서방성 제제 또는 코팅과 같이, 화합물이 신체로부터 신속하게 제거되지 않도록 하는 담체와 함께 제조될 수 있다.

[0448] 여기서 제공되는 조성물 및 방법의 한 구체예에서, 치료제는 서방성 전달 비히클로 국소적으로 투여되어, 예를 들어, 콜로이드 분산 시스템 또는 중합체 안정화 결정에 캡슐화되어 투여된다. 유용한 콜로이드 분산 시스템은 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 지질계 시스템을 포함하며, 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포좀을 포함한다. 예를 들어, 콜로이드 분산 시스템은 리포좀 또는 미소구체일 수 있다. 리포좀은 주사되거나 이식될 때 서방성 전달 비히클로 유용한 인공 막 소낭이다. 지질-중합체 접합체 및 리포좀의 일부 예는 참고로 전체가 본원에 통합되는 미국 특허 제5,631,018호에 개시된다. 서방성 전달 비히클의 다른 예는 생분해성 하이드로젤 매트릭스(미국 특허, 제5,041,292호), 수지상 중합체 접합체(미국 특허 제5,714,166호), 및 다소낭 리포좀(캘리포니아주 샌디애고에 소재하는 디포텍, Depofrm®

)(미국 특허 제 5,723,147호 및 제 5,766,627호)이다. 국소 주사(예, 피하 조직내로)를 위해 치료제를 캡슐화하는 데 적합한 미소구체의 한 타입은 D. Fletcher,Anesth. Anal. 84 : 90-94, (1997)에 개시된 폴리(D,L)락티드 미소구체이다. 예를 들어, 1 내지 5000 Units/ml과 같은 유효량의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 서방성 제제는 미용 제제 및 척수 손상 치료를 비롯한 다양한 용도를 위해 또는 다양한 상태의 치료에 이용될 수 있다.

[0449] 바람직한 혈액 농도는 혈장 농도에 의해 확인하면서 활성 제제를 연속 주입하여 유지할 수 있다. 치료 의사는 독성, 또는 골수, 간 또는 신장 손상으로 인해 언제 어떻게 치료를 종료, 중지 또는 더 낮은 투여량으로 조절할 것인지 알 것이다. 역으로, 치료 의사는 또한 임상 반응이 적절하지 않다면(독성 부작용 배제) 언제 그리고 어떻게 치료를 더 높은 수준으로 조절할 것인지 알 것이다.

[0450] sHASEGP 폴리펩티드 및/또는 그 억제자 단독 또는 치료 유효 제제와 같은 다른 제제와의 조합의 효능 및/또는 독성은 또한 공지 방법에 의해 평가될 수 있다 (예, O & Apos; Reilly, Investigational New Drugs 15 : 5-13 (1997)).

[0451] 6. 제조 물품

[0452] sHASEGP 폴리펩티드 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인 또는 전술한 제제 중 어느 것을 함유하는 조성물은 포장 재료, 포장 재료내의 여기서 고려되는 질병 또는 질환의 치료에 효과적인 여기서 제공된 화합물 또는 그 적합한 유도체, 및 상기 화합물 또는 그 적합한 유도체가 여기서 고려되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 것임을 나타내는 라벨을 함유하는 제조 물품으로 포장될 수 있다. 라벨은 선택적으로 치료가 보장되는 질환을 포함할 수 있다.

[0453] 여기서 제공되는 제조 물품은 포장 재료를 함유한다. 약학 제품을 포장하는 데 사용하기 위한 포장 재료는 공지되어 있다 (예, 미국 특허 제 5,323,907호, 제5,052,558호 및 제5,033,352호). 약학 포장 재료의 예는 블리스터 팩, 병, 튜브, 흡입기, 펌프, 백, 바이알, 용기, 시린지, 병, 및 선택된 제제 및 의도하는 투여 모드 및 치료에 적합한 포장 재료를 비제한적으로 포함한다. 여기서 제공된 화합물 및 조성물의 광범위한 제제는, HCV 감염이 증상 또는 원인의 매개자 또는 기여자로 작용하는 임의의 질환을 위한 다양한 치료에서처럼 고려된다.

[0454] 투여 안내서와 함께 조성물 및/또는 조합을 함유하는 키트가 또한 여기서 제공된다. 상기 키트는 추가로 복합체를 주사하기 위한, 대개 멸균 형태로 포장된 주사바늘 또는 시린지, 및/또는 포장된 알콜 패드를 포함할 수 있다. 안내서는 임상의 또는 환자에 의한 활성 제제의 투여를 위해 선택적으로 포함된다. 예를 들어, 1 내지 5000 유닛의 가용성 당단백질과 같은 유효량의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 5 내지 50 ㎕ 부피에 갖는 작은 부피 시린지를 함유하며, 선택적으로 점탄물을 함유하는 두번째 시린지를 함유하는 키트가 여기서 제공된다. 1 내지 500 유닛의 가용성 당단백질과 같은, 유효량의 sHASEGP 또는 그 가용성 사람 하이알우로니다제 도메인을 함유하는 작은 부피 시린지, 및 약물, 소분자, 단백질 또는 핵산과 같은 두번째 활성 성분의

치료량을 함유하는 작은 부피 시린지를 함유하는 키트가 또한 여기서 제공된다.

[0455] **K. 동물 모델**

[0456] 마우스와 쥐를 비롯한 설치류, 소, 닭, 돼지, 염소, 양, 고릴라를 비롯한 원숭이, 및 기타 영장류와 같은 형질전환 동물 모델 및 동물이 여기서 제공된다. 특히, sHASEGP 폴리펩티드를 암호하는 이종성 핵산을 함유하는 형질전환 비인간 동물, 또는 내인성 유전자의 프로모터 영역 또는 다른 조절 영역을 대체하거나 변화시켜 상기 폴리펩티드의 발현이 변경된 형질전환 동물이 제공된다. 그러한 동물은, 상동성 또는 다른 재조합 사건을 통하여, 강한 프로모터하에서의 발현에 의해서와 같이, 과다-발현되거나 잘못-발현될 수 있는 외인성 sHASEGP 유전자와 내인성 핵산 사이의 재조합을 촉진함으로써 생산될 수 있다.

[0457] 형질전환 동물은 미세주사, 리포펙션 및 기타 유전자 전달 모드를 비롯한 임의의 공지의 방법을 이용하여 핵산을 배아줄기 세포와 같은, 생식세포 또는 체세포내로 도입함으로써 생산될 수 있다. 일반적으로 핵산은 배아 줄기 세포(ES)와 같은 세포내로 도입되고, 이어서 ES 세포를 배반포내로 주입하고 상기 배반포를 수양모내로 이식하며, 이어서 형질전환 동물이 탄생한다. 일반적으로, 동물의 염색체내로 이종성 핵산 분자를 도입하는 것은 이종성 sHASEGP-암호 핵산과 내인성 핵산 사이의 재조합에 의해 발생한다. 이종성 핵산은 특이적 염색체로 표적화될 수 있다. 일부 경우에는, 넉아웃 동물이 생산될 수 있다. 그러한 동물은 그 염색체내의 sHASEGP 폴리펩티드 유전자와 생물학적으로 비활성이 된(대개 이종성 서열, 예, 항생제 내성 유전자의 삽입에 의해) 외인성 sHASEGP 폴리펩티드 유전자 사이의 상동성 재조합을 촉진함으로써 처음에 생산될 수 있다. 한 구체예에서, 이 상동성 재조합은 배아-유래 줄기(ES) 세포를 삽입 불활성화된 sHASEGP 폴리펩티드 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환시켜 상동성 재조합이 일어나고, 이어서 ES 세포를 배반포에 주입하고 배반포를 수양모내로 이식하여 키메라 동물("넉아웃 동물")을 탄생시킴으로써 실시되며, 상기 키메라 동물에서는 sHASEGP 폴리펩티드 유전자는 불활성화된다 (Capecchi, Science 244:1288-1292(1989) 참고). 키메라 동물은 추가의 넉아웃 동물을 생산하기 위해 이용될 수 있는 동종접합성 넉아웃 동물을 생산하기 위해 교배될 수 있다. 넉아웃 동물은 마우스, 햄스터, 양, 돼지, 소, 및 기타 비인간 포유류를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 넉아웃 마우스가 생산된다. 생성된 동물은 sHASEGP 폴리펩티드를 부족하게 발현하는, 암과 같은 특정 질병의 모델로서 작용할 수 있다. 그러한 넉아웃 동물은 예를 들어, 그러한 질병 또는 질환을 치료 또는 방지하는 능력에 대해 분자를 스크린하거나 시험하기 위해 그러한 질병의 동물 모델로서 이용될 수 있다.

[0458] sHASEGP 폴리펩티드를 과다 발현하는 것을 비롯한, 다른 타입의 형질전환 동물 또한 생산될 수 있다. 그러한 동물은 정상 유전자가 돌연변이, 과다발현 형태, 또는 기타 형태와 같은 변이체에 의해 대체된 동물인 "넉인" 동물을 포함한다. 예를 들어, 설치류의 내인성 유전자와 같은 한 종의 유전자는 사람과 같은 다른 종의 유전자에 의해 대체될 수 있다. 동물은 또한 다수의 통합 사건을 갖는 동물을 비롯하여, 염색체내의 다른 부위내로의 비-상동성 재조합에 의해 생산될 수 있다.

[0459] 1세대 형질전환 동물의 생산 후, 키메라 동물은 과다 발현 또는 잘못 발현된 sHASEGP 폴리펩티드를 갖는 추가의 동물을 생산하기 위해 교배될 수 있다. 그러한 동물은 마우스, 햄스터, 양, 돼지, 소, 및 기타 비인간 포유류를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 생성된 동물은 sHASEGP 폴리펩티드의 과다 발현 또는 잘못된 발현을 나타내는, 암과 같은 특정 질병의 모델로서 작용할 수 있다. 그러한 동물은 예를 들어, 그러한 질병 또는 질환을 치료 또는 방지하는 능력에 대해 분자를 스크린하거나 시험하기 위해 그러한 질병의 동물 모델로서 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 과다 발현 또는 잘못 발현된 sHASEGP 폴리펩티드를 갖는 마우스가 생산된다.

[0460] 하기 실시예는 단지 예시적인 목적으로 포함되며 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0461] **L. sHASEGP의 치료적 용도**

[0462] 도살장으로부터 얻은 천연 하이알우로니다제 효소가 40년 넘게 임상 효소 제제의 주된 공급원이었다. 소 및 양의 고환이 이 재료의 주요 공급원이다. 하지만 이들 임상적 효소 제제는 매우 조악하며, 30-100,000 Units/mg 사이의 공지의 비활성에 기초하여 0.5-5% 순도 범위의 제제로 판매된다. 따라서, 그들의 도살장 기원과 함께 그들의 순도 부족은 이들이 사람에게 면역원성이게 하고 야콥 크루츠펠트 병 및 기타 소 및 양 병원균의 잠재적 공급원이 되게 한다. 소 및 양 하이알우로니다제 제제에 대한 아나필락시스 반응이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0463] 소 또는 박테리아 유래 하이알우로니다제는 과다한 하이알우론산과 관련된 질병의 치료 및 생리학적 유체 및/또는 치료제의 순환 개선에 사용되어 왔다. 예를 들어, 소 하이알우로니다제는 안과 수술을 위해 눈앞쪽, 눈뒤쪽 및 테논(TENON) 아래 블록에서 마취제와 동시 주사될 수 있다. 더욱이, 그 부재하에서는 외과적 합병증이 증가

한다 (Brown SM et al.J Cataract Refract Surg. 1999 Sep; 25 (9): 1245-9). 소 하이알우로니다제는 또한 빈카 알카로이드와 같은 괴사 물질의 정맥옆 주사로부터의 국소적 괴사에 해독제로 이용된다 (Few, B. J. (1987) Amer.J.Matern. Child Nurs. 12,23-26). 소 고환 하이알우로니다제는 또한 신경절 낭의 치료에 유용하다 (Paul et al. JHand Surg 1997 Apr; 22 (2): 219-21). 하이알우로니다제는 또한 수액피하주사에서 유체의 피하 전달을 촉진하기 위해 이용될 수 있다 (Berger EY, Am Geriatr Soc 1984 Mar; 32 (3): 199-203). 하이알우로니다제는 또한 점탄물을 수용하는 백내장 환자 및 녹내장 환자의 눈에서 안내 압력을 감소시키기 위하여 이용되어 왔다 (1989년 4월 11일에 발행된 미국 특허 제4,820,516호).

[0464] 소 또는 박테리아 유래 하이알우로니다제는 또한 화학요법제의 활성 및/또는 종양의 화학요법에의 접근성을 개선하기 위한 "스프레딩제"로 이용되었다 (Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32: 173, abstract no. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45: H. 9). 하이알우로니다제를 이용한 조합 화학요법은 방광암(Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28: 304-307), 편평세포 암종 (Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120: 293-297), 유방암(Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol.118 : 591-596), 및 위장암(Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res.8 : 391-396)을 비롯한 다양한 암의 치료에 효과적이다. 하이알우로니다제는 뇌암(신경교종)의 치료에서 단독 치료제로서 효과적이다 (1988년 4월 7일에 공개된 PCT 공개출원 WO88/02261호). 하이알우로니다제의 투여는 또한 췌장, 위, 결장, 난소, 및 유방의 화학요법-내성 종양의 반응성을 유도한다 (Baumgartner et al., 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al., 1986, Proc.Amer. Assoc. Cancer Res. 27: 390). 불행히도, 그러한 하이알우로니다제의 오염물 및 비 인간 특성은 아나필락시스 반응을 야기한다.

[0465] 간접적인 항암 효과에 더하여, 소 유래 하이알우로니다제는 직접적인 항발암 효과를 갖는다. 하이알우로니다제는 마우스에 이식된 종양의 성장을 방지하며 (De Maeyer et al., 1992, Int. J. Cancer 51: 657-660) 발암물질에 노출시 종양 형성을 억제한다 (Pawlowski et al., 1979, Int. J. Cancer 23: 105-109; Haberman et al.,1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D. C., 22: 105, abstract no. 415).

[0466] 특히 화학요법에서 종래의 화학요법제와 함께 또는 단독 화학요법제로서, 치료제로서 소-유래 하이알우로니다제의 가치를 고려할 때, 사람 기원의 하이알우로니다제의 실질적으로 순수한 제제가 당업계에 필요하다. 또한, 상업적으로 중요한 양의 효소를 제공하기 위해 하이알우로니다제를 만드는 효율적이고, 비용 절감적인 방법이 필요하다. 본 발명은 이들 문제를 해결한다.

[0467] 하이알우론산은 세포외 매트릭스의 필수 성분이다. 하이알우론산은 포유류의 연결 조직에서 발견되며 눈의 유리체의 주요 구성원이다. 연결 조직에서, 하이알우론산과 관련된 수화의 물은 조직간에 공간을 형성하여 세포 이동 및 증식을 위한 환경을 형성한다. 하이알우론산은 신속한 발생, 재생, 회복, 배발생, 배아 발생, 상처 치유, 혈관신생, 및 종양 생성을 비롯한 세포 이동성과 관련된 생물학적 현상에서 중요 역할을 한다 (Toole, 1991, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand et al., 1992, Int. J. Cancer 52: 1-6; Knudson et al., 1993, FASEB J. 7: 1233-1241). 또한, 하이알우론산 농도는 종양 공격성과 상관있다 (Ozello et al., 1960, Cancer Res. 20: 600-604; Takeuchi et al., 1976, Cancer Res. 36: 2133-2139; Kimata et al., 1983, Cancer Res. 43: 1347-1354).

[0468] 척수 손상 후, 별아교세포에 의해 아교 흉터가 생성되며 이는 콘드로이친 설페이트 프로테오글리칸(CSPG)을 함유한다. CSPG는 축삭 성장의 억제에서 중요 역할을 한다 (Levine, 1994; Powell et al., 1997). 예를 들어, 태아 발생동안, CSPG는 축삭을 격퇴시키며 신경 세포 부착을 억제한다. CSPG는 또한 경계 형성에 중요한 역할을 한다 (Snow et al., 1990,1992; Powell and Geller, 1999). 또한 CSPG의 발현은 CNS의 손상 후에 증가한다 (Mckeon et al., 1991; Davies et al.,1997).

[0469] 연구결과 CSPG의 억제 효과가 주로 콘드로이친 설페이트(CS) 글리코스아미노글리칸(GAG) 당쇄에 기인함이 밝혀졌다 (Snow et al., 1990; Cole and McCable, 1991; Geisert and Bidanset, 1993). 이것은 경막내 투여될 때 박테리아 콘드로이티나제의 투여가 축삭 재생을 촉진한다는 발견에 의해 지지된다. 더욱이, 전기생리학적 실험은 재생된 CST 축삭이 기능적 관련성을 확립하는 것으로 결정하였다 (Bradbury, et al 2002). 그들의 직접적인 억제 효과에 더하여, CSPG는 또한 세포 부착 분자 또는 향신경 인자와 상호작용하여 신경돌기 과성장에 영향을 줄 수도 있다 (Roberts et al., 1988; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Milev et al., 1994). 재조합 포유류 하이알우로니다제는 따라서 아교 상처에서 CSPG의 억제를 역전시키고 손상 후 축삭 재생을 촉진시키는 데 유용하다.

[0470] 아교 흉터에서 CSPG를 충분히 분해시키는 데 필요한 sHASEGP의 양은 변할 것이다. 일부 경우에는, 흉터에서 CSPG를 제거하기 위하여, 경막내 전달에 의해 10-5000 유닛의 sHASEGP를 반복 투여하는 것이 필요할 것이다. 다른 경우에는, 서방성 제제의 사용을 통한 sHASEGP의 지연된 방출이 바람직할 수도 있다. 다르게는, sHASEGP를 암호하는 유전자 치료 벡터의 투여가 CSPG의 소거를 개선하는데 효과적일 수도 있다.

[0471] sHASEGP는 또한 화학핵소체용해술로 알려진 과정에서 원반탈출증의 치료에 유용할 수 있다. 콘드로이티나제 ABC, 및 sHASEGP와 유사한 기질을 절단하는 효소는 허리 척수에서 원반내 압력의 감소를 유도할 수 있다 (Sasaki et al., 2001, Ishikawa et al., 1999). 세 가지 타입의 디스크 손상이 있다. 돌출 디스크는 그대로이지만 튀어나온 것이다. 압출된 디스크에서는, 섬유성 래퍼가 찢어지며 NP가 흘러나오지만, 여전히 디스크에 연결되어 있다. 격리된 디스크에서는, NP 단편이 디스크로부터 느슨하게 부숴지며 척추 관에서 자유상태이다. 화학핵소체용해술은 돌출 다스크 및 압출 디스크에 효과적이지만, 격리 디스크 손상에는 효과적이지 않다. 미국에서는, 화학핵소체용해술은 허리(하부)척수에서의 사용에만 승인된다. 다른 국가에서는, 경부(상부 척추) 헤르니아 치료에 성공적으로 이용되었다. 따라서 화학핵소체용해술은 디스크 압력 감소가 바람직할 경우 디스크 수술에 대한 보수적 대안이다.

[0472] 당단백질상의 탄수화물쇄의 정확한 조성 및 구조는, 간 및 소포체 시스템의 세포가 특정 탄수화물을 갖는 순환 당단백질을 결합하여 내부화시킬 수 있으므로, 그 혈청 수명에 직접 영향을 줄 수 있다. 간세포는 말단(즉, 폴리펩티드에 대하여 글리칸의 가장 마지막) Gal 잔기를 갖는 올리고당 쇄를 인식하는 수용체를 그 표면에 가지며, 대식세포는 말단 Man 또는 GlcNAc 잔기를 위한 수용체를 함유하며, 간세포와 림프구는 노출된 푸코스 잔기를 위한 수용체를 갖는다. 하지만, 시알산-특이적 수용체는 발견되지 않았다. 일반적으로, 올리고당의 공간적 배열에 다소 의존함에도 불구하고, 간 및 소포체 시스템에서 세포 표면 수용체에 의해 인식되는 노출된 당 잔기의 수가 많을수록, 당단백질은 더 신속하게 혈청으로부터 제거될 것이다. 하지만, 시알산-특이적 수용체의 부재때문에, 시알산으로 종결되거나 "캡핑"된 모든 가지를 갖는 올리고당은 그들이 부착되는 단백질의 제거를 촉진하지 않을 것이다.

[0473] 당단백질상의 올리고당 쇄의 존재 및 특성은 또한 간 및 소포체 세포상의 당-특이적 수용체에 의한 그 인식에 더하여 중요한 생화학적 특성에 영향을 줄 수 있다. 당단백질로부터 탄수화물의 제거는 대개 그 용해도를 감소시킬 것이며, 또한 정확한 폴리펩티드 접힘 패턴을 불안정화시키고/거나 프로테아제-민감성 부위를 탈보호시켜 단백질 분해에 대한 민감성을 증가시킬 수 있다. 유사한 이유로, 단백질의 당화 상태는 면역 시스템에 의한 그 인식에 영향을 줄 수 있다.

[0474] sHASEGP는 동결보존, 및 세포질내 정자 주사(ICSI)와 같은 기타 생체외 수정 기법에 앞서 난자를 둘러싼 큐물러스 세포를 제거하기 위해 이용될 수 있다. 하이알우로니다제는 완충된 염 용액중의 10-200 U/ml 사이로 수집된 난모세포에 첨가될 수 있다. 난모세포는 흡입에 의해, 방출된 큐물러스 세포로부터 분리되고 하이알우로니다제가 없는 배지로 여러번 세척된다. 이어서 난자를 동결보존 또는 IVF 기법을 위해 처리할 수 있다.

[0475] sHASEGP는 또한 화학요법제가 고형 종량내로 더욱 효과적으로 침투하도록 하는 데 유용하다. sHASEGP는 항암제와 함께 종양내로 주사되거나, 또는 파종 암 또는 종양 도달이 어려운 경우에는 정맥내로 주사될 수 있다. 항암제는 화학요법제, 항체, 펩티드, 또는 유전자 치료 벡터, 바이러스 또는 DNA일 수 있다. 부가적으로, sHASEGP는 다문화성 약물 내성을 획득한, 이전에는 화학불응성인 종양에서 감작화를 위한 사이클링 풀내로 종양 세포를 보내기 위해 이용될 수 있다 (St Croix et al Cancer Lett 1998 Sep 11; 131(1) : 35-44). sHASEGP는 또한 모노클로날 항체, 사이토카인 및 기타 약물과 같은 생물물질을 글리코스아미노글리칸을 축적하는 종양으로 전달하는 것을 개선하기 위해 유용하다. 많은 종양은 글리코스아미노글리칸의 대사에 관련된 유전자가 결실되어, 국소화된 축적이 항종양 제제 및 면역 시스템이 종양 덩어리에 도달하는 것을 막을 수 있다.

[0476] sHASEGP는 또한 종래의 화학요법에 내성인 종양의 민감성을 증가시키기 위해 이용될 수 있다. 한 구체예에서, sHASEGP는 종양 부위 주위에서의 확산을 증가시키고(예, 화학요법 인자의 순환 증가, 종양 부위 및 그 주변에서 화학요법제의 순환 및/또는 집중의 촉진), 종양 세포 이동성을 억제하기 위해(예, HA 분해에 의해) 및/또는 어팝토시스의 종양 세포 역치를 낮추기 위해(즉, 종양 세포를 아노이키스(anoikis)상태, 세포 사멸을 촉진할 수 있는, 바람직하게는 아노이키스의 세포의 프로그램된 세포 사멸을 우선적으로 촉진할 수 있는 화학요법제 또는 다른 제제의 작용에 종양 세포가 더 민감하도록 하는 상태로 가져감) 효과적인 양으로 LuCa-1 결함과 관련된 종양을 갖는 환자에 투여된다. 본원에서 사용된 것으로서 화학요법제는 종양 세포 성장의 억제를 촉진하는, 그리고 바람직하게는 종양 세포 사멸을 우선적으로 촉진하는, 합성(예, 시스플라틴) 및 천연(예, 종양 괴사 인자 IF)의 모든 분자를 포함하는 것을 의미한다.

[0477] 특히 관심의 대상은 비-암성(정상) 세포에 대하여 하이알우로니다제 활성이 검출불가능하게 감소된 전이성 및 비전이성 암, 특히 전이성 암의 치료를 위한 sHASEGP의 용도이다. sHASEGP는 다양한 암, 특히 침입성 종양 중 어느 것의 치료에서 화학요법제(단독 또는 다른 화학요법제와 함께)로 이용될 수 있다. 예를 들어, sHASEGP는 작은 폐세포 암종, 편평 폐세포 암종 및 유방, 난소, 머리 및 목의 암, 또는 하이알우로니다제의 농도 감소 또는 결함이 있는 LuCa-1(hpHAse) 유전자(예, 적절한 hpHAse 수준의 발현을 제공하지 않거나 적절한 수준의 하이알우로니다제 활성을 제공하지 않는 결함있는 hpHAse를 암호하는 LuCa-1 유전자)와 관련된 임의의 다른 암, 또는 하이알우로난 대사 감소와 관련된 다른 결함의 치료에 이용될 수 있다.

[0478] sHASEGP는 분해가 일어나는데 세포 참여를 필요로 하지 않으므로, 결함이 있는 HA 대사와 관련된 암의 치료에 바람직하다.

[0479] 투여에 적합한 구체적인 투여량은 전술한 인자에 따라 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다 (예, Harrison's Principles of Internal Medicine,1 lth Ed.,1987 참고). 또한, 사람에서 적절한 투여량을 위한 추정은 생체외에서 sHASEGP의 효소 활성의 정도의 결정 및/또는 동물 연구에서 효과적인 투여량으로부터 외삽될 수도 있다. 예를 들어, 70-300 TRU 하이알우로니다제는 중복 면역 부전증 마우스에서 종양 부하를 감소시키는 데 효과적이다. 이 정보를 이용하여, 평균 70 kg 사람에서 해당 투여량은 약 250,000-1,200,000 TRU 하이알우로니다제 범위일 것이다. 사람 환자에게 투여된 sHASEGP의 양은 대개 1 TRU 내지 5,000,000 TRU의 효소 활성의 범위이며, 바람직하게는 약 1,000 TRU 내지 2,500,000 TRU 사이이며, 더욱 바람직하게는 약 100,000 TRU 내지 1,500,000 TRU 사이이며, 정상적으로는 약 250,000 TRU 내지 1,200,000 TRU 사이이며, 약 725,000 TRU가 평균 처방 투여량을 나타낸다.

[0480] 한 구체예에서, sHASEGP는 약 150,000 TRU/cc의 농도로 sHASEGP를 함유하는 0.15M 염수 용액으로 조제된다. 제제는 이어서 15,000 TRU/환자 체중 kg으로 정맥내 주사된다. 다르게는, 효소 제제는 또한 피하로 주사되어 하이알우로니다제가 종양 부위에서 관류하도록 한다. 바람직한 구체예에서는, sHASEGP는 종양 주변에 또는 종양 덩어리내로 주사된다. 다른 바람직한 구체예에서는, sHASEGP는 리포좀으로 조제되고 정맥내로 또는 LuCa-1(hpHAse) 유전자의 결함과 관련된 암종 세포의 부위 또는 그 근처에서 주사되어 전달된다. sHASEGP의 정맥내 주사는 종양 부위에서 sHASEGP를 야기한다. 더욱이, 수퍼-시알화된 sHASEGP는 sHASEGP상의 말단 시알산이 소포체 시스템에 의해 순환계로부터 효소가 제거되는 것을 방지하므로 비경구 투여에 바람직하다. 비시알화된 소 및 양 하이알우로니다제와 과 시알화된 sHASEGP를 비교한 결과 실질적으로 더 바람직한 약력학이 얻어짐이 밝혀진다.

[0481] 유전자 치료의 촉진

[0482] 대부분의 유전자 전달 비히클의 생체내 효능은 생체외에서 발견된 효능에 일치하지 않는다. 글리코스아미노글리칸은 많은 세포 타입내로의 DNA 및 바이러스 벡터의 전달 및 확산을 방해할 수 있다. 그러한 세포외 매트릭스 물질의 농도는 상기 과정을 상당히 방해할 수 있다. Dubensky et al., (Proc Natl Acad Sci U S A 1984 Dec; 81 (23): 7529-33)는 콜라게나제아 배합될 때 하이알우로니다제가 생체내에서 DNA의 형질도입을 촉진할 수 있음을 입증하였다. 아데노 관련 바이러스는 또한 하이알우로니다제 매개 유전자 치료에 민감함이 입증되었다 (Favre et al, (Gene Ther 2000 Aug; 7 (16): 1417-20)).

[0483] 본 발명자들은 세포외 매트릭스에서 한정된 크기의 채널이 sHASEGP로 개방됨을 여기서 결정하였다. 이들 기공은 직경이 약 200-500 nm보다 큰 물질의 확산을 증가시키지 않는다. 하지만, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 DNA 복합체와 같은 작은 분자는 sHASEGP 매개 확산에 민감하다.

[0484] 다르게는, 바이러스는 예를 들어 표적 조직내에서 그들의 복제 및 확산을 촉진하기 위해 sHASEGP 유전자로 무장될 수 있다. 표적 조직은 바이러스가 종양내에서 선택적 복제를 할 수 있는 암성 조직일 수 있다. 바이러스는 또한 바이러스가 조직 특이적 프로모터하에서 선택적으로 복제하는 비용해성 바이러스일 수 있다. 바이러스가 복제할 때, 바이러스 유전자와 sHASEGP의 동시발현은 생체내에서 바이러스의 확산을 촉진할 것이다.

[0485] 다르게는 대상 핵산 및 sHASEGP는 동시에 또는 연속적으로 사용되거나 또는 시간에 걸쳐 시차를 두고 사용될 수 있다. 동시란 공동투여를 말한다. 이 경우에, 이들 두 필수 성분은 혼합되어 투여되기 전에 조성물을 형성하거나, 또는 세포 또는 숙주 유기체에 동시에 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 조합 생성물의 어느 성분이 먼저 투여되는지에 상관없이, 이들을 연속적으로 투여하는 것이 가능하며, 즉 하나에 이어 다른 하나를 투여하는 것이 가능하다. 마지막으로, 시간에 따라 엇갈리거나 간헐적이며, 규칙적이거나 규칙적이지 않은 간격으로 중단하고 다시 시작하는 투여 모드를 사용하는 것이 가능하다. 두 성분의 투여 경로 및 부위는 상이할 수 있음을 주목한

다. 한 가지 특히 바람직한 구체예에 따라, sHASEGP는 핵산 앞에 투여되며, 두 성분의 투여 경로는 바람직하게는 유사하다. 주사간의 시간 간격은 중요하지 않으며 당업자에 의해 정의될 수 있다. 10분 내지 72시간의 간격, 유익하게는 30분 내지 48시간, 바람직하게는 1 내지 24시간, 그리고 매우 바람직하게는 1 내지 6시간의 간격을 추천할 수 있다.

[0486] 또한, 본 발명에 따른 조합 생성물은 또한 핵산 투여를 개선하기 위한 분자 하나 이상과 배합될 수 있다. 상기 분자는 핵산에 보호 효과(세포에서의 분해와 관련한 보호)를 갖거나, 숙주 세포에서 그 침투 또는 발현을 개선하거나(용해성 펩티드, 핵 국소화 시그널 등), 한 가지 특정 세포 타입이 표적화되도록 하거나(세포 표면 단백질을 인식하는 리간드 또는 항체 등), 또는 치료 효과를 지속시키는 분자(면역억제제 등)일 수 있다. 조합 생성물은 또한 형질감염을 촉진하는 제제(단백질 등)와 배합될 수 있다.

[0487] 본 발명에 따른 조합 생성물은 국소 또는 비경구 투여 또는 소화 경로에 의한 투여에 대한 관점으로 제조될 수 있다. 특히 언급될 수 있는 경로는 위장관내, 피하, 심장내, 정맥내, 복강내, 윤활막내, 종양내, 허파내, 비강내 및 기관내 경로이며, 매우 특히 근육내 경로이다. 투여는 특정 시간 간격 후에 한번 또는 여러번 반복되는 투여량 또는 단일 투여량으로서, 공지된 임의의 수단(주사, 경구 경로, 에어로졸, 점안, 등)에 의해 이루어질 수 있다. 투여 경로는 대상 유전자가 전달되고 질병이 치료되도록 조절될 수 있다. 제제는 약학적 허용 비히클(부형제, 아쥬반트 등)을 포함할 수 있다. 세포외 매트릭스 및 대상 핵산의 무조직화로 이끄는 물질은 바람직하게는 약학적 용도에 적합하며 고장성, 저장성 또는 등장성일 수 있는 완충액에 용해된다. 다양한 완충액이 가능하다. 예시적으로 언급될 수 있는 것들은 생리학적 염수용액(0.9% NaCl), 비생리학적 염수 용액(1.8% NaCl), 헤르페스-링거 용액, 락테이트-링거 용액, Tris-HCl에 기초한 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5 내지 8, 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 내지 8, 1 mM $MgCl_2$), 포스페이트 완충액(크렙스 포스페이트 $H_2O$ 완충액), 당(글루코스, 수크로스, 트레할로즈 등) 용액, 또는 간단히 물이다.

[0488] 수액 피하 주사(hypodermoclysis)

[0489] 유체를 피하로 주입하는 수액 피하 주사는 다소 내지 온건하게 탈수된 성인 환자, 특히 노인들에게 적합한 유용하고 용이한 수화 기법이다. 이 방법은 안전한 것으로 간주되며 어떤 심각한 합병증도 일으키지 않는다. 가장 빈번한 역효과는 국소 마사지 또는 전신성 이뇨에 의해 치료될 수 있는 온화한 피하 부종이다. 대략 3 L가 두 개의 별도 부위에서 24시간내에 제공될 수 있다. 일반적인 주입 부위는 가슴, 복부, 허벅지 및 상부 팔이다. 바람직한 용액은 정상 염수이지만, 절반-정상 염수, 염수를 가진 글루코스 또는 5% 글루코스와 같은 다른 용액 또한 이용될 수 있다. 포타슘 클로라이드는 필요하면 용액 백에 첨가될 수 있다. 추가적으로, 다른 약물이 유사한 경로로 전달될 수 있다. 사람 sHASEGP는 유체 흡수를 증가시키고 전체적인 투여 속도를 증가시키기 위하여 첨가될 수 있다. 사람 sHASEGP는 소 효소와 달리 면역원성일 가능성이 낮다는 점에서, 도살장에서 얻은 효소에 비하여 반복적인 피하 수액 주사에 바람직하다. 이것은 가족 구성원 또는 간호원에 의해 가정에서 투여될 수도 있으며, 기법은 모든 가정 의학 의사에게 익숙하다.

[0490] 외래 환자의 경우, 피하 수액 주사 부위는 복부, 상부 가슴, 유방 위, 갈비사이 공간위 및 어깨 영역을 포함한다. 누워만 있는 환자의 경우, 바람직한 부위는 허벅지, 복부 및 상부 팔의 바깥 부분이다. 1 내지 4일 후, 주사바늘 및 튜브를 바꿔줘야 하며, 주입 세트는 합병증없이 더 오랜 기간동안 그 자리에 유지될 수 있다. 첫번째 아침 주입 전에 피하 부위에서 150 U의 sHASEGP를 주고, 하루 세 번 한 시간 또는 두 시간에 걸쳐 500 mL 환괴의 투여가 이루어질 수 있다.

[0491] 치료 주사의 용이화

[0492] 경피로 주사된 많은 분자는 천천히 그리고 매우 낮은 효율로 순환계에 도달한다. 몇 가지 인자가 피하로(SC) 또는 근육내로(IM) 주사되는 분자의 약동학 및 약역학을 조절한다. 일반적으로, 더 큰 분자는 순환계로의 능동 수송없이 더 느리게 그리고 덜 효율적으로 순환계에 도달한다. 피하 생물이용성은 SC 대 정맥내 투여를 위한 곡선 아래 영역의 비($AUC_{SC}/AUC_{정맥내}$)를 계산함으로써 결정된다. 두번째 인자는 피하에서 분자의 격리에서 역할을 할 수도 있는 매트릭스 분자에 대한 친화성 및 전하이다. 만일 이들 물질이 국소적으로 분해되면 이들은 그들의 원하는 표적에 절대 도달하지 못하며 따라서 표적 기관에 대해 감소된 전체적인 전신 생물이용성을 나타낸다.

[0493] 큰 단백질은 정상적으로 정맥내로 주어져 의약이 혈류에서 직접 이용가능하도록 한다. 하지만, 의약이 피하로, 근육내로, 또는 표피내로 제공될 수 있으면, 이들 투여 형태가 환자에게 있어 다루기가 더 용이하므로 유익할 것이다. 특히, 의약이 전체 수명동안 규칙적으로 섭취되어야 하고 치료가 일찍, 환자가 아동일 때 시작된다면 그러하다. 하지만, 170 내지 300 kDa의 응집 인자 VII와 같은, 매우 크고 불안정한 분자를 갖는 의약은 흡수가

충분하지 않고 분해가 심하므로, 피하로, 근육내로 또는 표피내로 주어지면 매우 낮은 생물이용성을 갖는다.

[0494] 피하로 투여된 많은 생물질의 생물이용성을 증가시킬 필요에 더하여, 보다 신속한 약동학 또한 비상 의약의 경우에 매우 중요하다. 많은 환자에서 정맥내 접근에 도달하는 데 필요한 시간은, 전신성으로 투여될 때 신속하게 작용할 약물이 이용되는 것을 막을 수 있다. 일부 경우에, 정맥내 접근에 도달하지 못하면 피하 주사가 이루어지고 이로 인해 표적 기관에 도달하는 데 있어서 추가의 지연이 일어난다. 따라서, 정맥내 접근을 이루기 위해 필요한 시간을 감수하는 것보다는, 첫번째 피하 약물의 보다 신속한 이용가능성이 치료로서 유용할 것이다. 정맥내 뿐만 아니라 피하로 전달될 수 있는 분자의 예는 에피네프린, 아트로핀, 나르칸, 리그노케인, 및 덱스트로스를 포함한다.

[0495] 경피로 주사되는 많은 분자들은 느리게 또는 매우 낮은 효율로 순환계에 도달한다. 몇가지 인자는 피하로(SC) 또는 근육내로(IM) 주사되는 분자의 약력학 및 약동학을 조절한다. 일반적으로, 더 큰 분자는 순환계로의 능동 수송없이 더 느리게 그리고 덜 효율적으로 순환계에 도달한다. 피하 생물이용성은 SC 대 정맥내 투여를 위한 곡선 아래 영역의 비($AUC_{SC}/AUC_{정맥내}$)를 계산함으로써 결정된다. 두번째 인자는 피하에서 분자의 격리에서 역할을 할 수도 있는 매트릭스 분자에 대한 친화성 및 전하이다. 만일 이들 물질이 국소적으로 분해되면 이들은 그들의 원하는 표적에 절대 도달하지 못하며 따라서 표적 기관에 대해 감소된 전체적인 전신 생물이용성을 나타낸다.

[0496] 큰 단백질은 정상적으로 정맥내로 주어져 의약이 혈류에서 직접 이용가능하도록 한다. 하지만, 의약이 피하로, 근육내로, 또는 표피내로 제공될 수 있으면, 이들 투여 형태가 환자에게 있어 다루기가 더 용이하므로 유익할 것이다. 특히, 의약이 전체 수명동안 규칙적으로 섭취되어야 하고 치료가 일찍, 환자가 아동일 때 시작된다면 그러하다. 하지만, 170 내지 300 kDa의 응집 인자 VIII와 같은, 매우 크고 불안정한 분자를 갖는 의약은 흡수가 충분하지 않고 분해가 심하므로, 피하로, 근육내로 또는 표피내로 주어지면 매우 낮은 생물이용성을 갖는다.

[0497] 피하로 투여된 많은 생물질의 생물이용성을 증가시킬 필요에 더하여, 보다 신속한 약동학 또한 비상 의약의 경우에 매우 중요하다. 많은 환자에서 정맥내 접근에 도달하는 데 필요한 시간은, 전신성으로 투여될 때 신속하게 작용할 약물이 이용되는 것을 막을 수 있다. 일부 경우에, 정맥내 접근에 도달하지 못하면 피하 주사가 이루어지고 이로 인해 표적 기관에 도달하는 데 있어서 추가의 지연이 일어난다. 따라서, 정맥내 접근을 이루기 위해 필요한 시간을 감수하는 것보다는, 피하 약물의 보다 신속한 이용가능성이 치료로서 유용할 것이다. 정맥내 뿐만 아니라 피하로 전달될 수 있는 분자의 예는 에피네프린, 아트로핀, 나르칸, 리그노케인, 및 덱스트로스를 포함한다.

[0498] 본 발명의 추가 효과는 주사 부위에서 용액의 압력 및 부피와 관련된 고통 및 이환없이 등가의 또는 더 큰 부피의 용액을 SC 또는 IM으로 전달하는 능력이다.

[0499] 유리체 출혈

[0500] 유리체 절제술의 실시동안 망막의 추가 탈착 또는 찢어짐을 야기할 가능성을 최소화하는 노력으로, 미국 특허 제5,292,509호(Hageman)는 유리체의 제거에 앞서, 일부 무-프로테아제 글리코스아미노글리칸 효소를 유리체내로 주입하여, 유리체가 망막으로부터 탈결합되거나 "변연부망막해리"되도록 할 것을 제안하였다. 그러한 유리체의 변연부망막해리 또는 탈결합은 유리체가 제거될 때 추가의 망막 찢어짐 또는 탈착이 일어날 가능성을 최소화하기 위한 것으로 알려져 있다. 이러한 유리체 변연부망막해리를 야기하기 위해 이용될 수 있는 특정 프로테아제가 없는 글리코스아미노글리카나제 효소의 예는 콘드로이티나제 ABC, 콘드로이티나제 AC, 콘드로이티나제 B, 콘드로이친-4-설파타제, 콘드로이친 6-설파타제, 하이알우로니다제 및 베타-글루쿠로니다제를 포함한다.

[0501] 하이알우로니다제 효소가 미국 특허 제5,292,509호(Hageman)에 개시된 유리체절제술 보조 용례를 비롯하여, 다양한 안과적 용례에 사용가능한 것으로 알려져 있지만, 공개된 연구들은 하이알우로니다제 효소 자체가 망막 및/또는 눈의 다른 해부학적 구조에 독성일 수 있음을 나타낸다. The Safety of Intravitreal Hyaluronidase; Gottlieb, J. L.;Antoszyk, A. N.,Hatchell, D. L. and Soloupis, P., Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 11,2345-52 (1990)를 참고한다. 더욱이, 하이알우로니다제의 불순한 도살장 제제의 사용은 포도막염 또는 눈의 염증을 야기할 수 있다. 따라서 사람 sHASEGP의 사용이 그 증가된 효능, 순도, 및 반복 투여 후 면역원성 반응 및 항체 매개 중화를 야기할 수 있는 동물 기원의 부족면에서 바람직하다. 다른 구체예에서는, sHASEGP의 PEG화 형태가 눈에 주사될 수 있다. 그러한 PEG화 sHASEGP는 그렇게 빨리 유리체로부터 제거되지 않으며 보다 오랜 기간동안 유리체에서 그 활성을 유지한다.

[0502] 일부 하이알우로니다제 제제의 안과적 독성이 다른 연구자들에 의해 확인되었으며, 이들은 그러한 하이알우로니다제 제제를 동물 독성 모델에서, 눈의 실험적으로 유도된 혈관신생을 야기하기 위한 독성 자극제로 사용할 것

을 제안하였다 (An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit; Antoszyk, A. N., Gottleib, J. L., Casey, R. C., Hatchell, D. L. and Machemer, R., Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 1,46-51 (1991) 참고). 수은계 오염물 및 소 또는 박테리아 유래된 오염물이 없는 매우 정제된 sHASEGP의 사용은 안내 수술에 바람직하다. 더욱이, 재조합 사람 sHASEGP는 소 병원균이 없는 순도 및 면역원성 위험의 감소면에서 도살장 유래 제제에 비하여 바람직하다. 가장 바람직한 것은 PEG화된 sHASEGP이다.

[0503] 따라서 사람 sHASEGP를 이용하는 효소적 방법이 포유류 눈의 안과 질환 치료를 위해 제공된다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 sHASEGP는 유리체내에서 그 거주를 지연시키고 국소적 섭취를 방지하기 위해 PEG화된다. 혈관신생의 방지, 및 망막에 독성인 물질을 유리체로부터 제거하는 속도의 증가는, 눈에 독성 손상을 야기함없이, 치료된 눈의 유리체액을 액화시키는 데 효과적인 양의 하이알우로니다제를 투여하여 이루어진다. 유리체액의 액화는 유리체 실로부터 액체 교환의 속도를 증가시킨다. 이러한 교환 증가는 그 존재가 안과적 및 망막 손상을 야기하는 물질 및 상태를 제거한다.

[0504] sHASEGP의 미용적 용도

[0505] 하이알우로니다제가 결합수의 보유를 일으키는 기본 물질의 긴 점성다당류 쇄를 탈중합화시키고, 모세관 압착에 의해, 대사 폐기물을 제거하는 유기 액체의 확산을 늦추는 효과를 가짐이 알려져 있다. 지방 세포의 지방 과부하와 관련된 폐기물 및 물의 그러한 보유는 전통적인 "돼지가죽" 부종 또는 "오렌지껍질" 부종을 구성한다. 따라서 이러한 탈중합화는 점성다당류의 긴 쇄를 보다 짧은 쇄로 자르고, 따라서 결합수 및 폐기물의 제거, 정맥 및 림프 순환의 회복 및 국소 부종의 제거를 일으킨다.

[0506] 따라서 피하 투여에 의한 sHASEGP의 사용이 소위 셀룰라이트의 축적에 관련된 글리코스아미노글리칸의 제거에 바람직하며 림프 유동을 촉진시키는 데 바람직하다. 사람 sHASEGP는 도살장 유래 단백질의 염증성 성분 없이 상기 글리코스아미노글리칸을 제거할 수 있으며 순도가 높고 면역원성일 가능성이 낮다는 점에서 셀룰라이트의 치료에 바람직하다. sHASEGP는 반복적 피하 주사를 통해, 연고 또는 크림 형태로 경피 전달을 통해, 또는 주사가능한 서방성 제제의 사용을 통해 투여되어 글리코스아미노글리칸의 연속적인 분해를 촉진하고 그들의 회복을 방지할 수 있다.

[0507] 기관 이식

[0508] 하이알우로난은 부분적으로 그 분자 크기에 관련되는 몇가지 생물학적 효과를 갖는다 (West, D. C., Kumar, S. Exp. Cell. Res. 183, 179-196,1989). 기관에서 하이알우로난의 함량은 그 기관의 다른 염증 상태에서 증가한다. 따라서, 하이알우로난의 농도 증가는 허파꽈리염(Nettelbladt O et al, Am Rev Resp Dis 1989; 139: 759-762) 및 심근경색(Waldenstrom et al, J Clin Invest 1991; 88 (5):1622-1628)과 같은 염증-면역학적 손상을 특징으로 하는 다른 기관으로부터의 조직에서 나타났다. 다른 예는 신장 (Ha'llgren et al, J Exp Med 1990a; 171: 2063-2076; Wells et al, Transplantation 1990; 50: 240-243), 소장 (Wallander et al, Transplant Int 1993; 6: 133-137) 또는 심장(Hallgren et al, J Clin Invest 1990b; 85 : 668-673) 이식 후 이종이식 거부; 또는 바이러스 기원의 심근 염증(Waldenstrdm et al, Eur J Clin Invest 1993; 23:277-282)이다.

[0509] 기관의 이식과 관련된 사이질 부종의 발생은 이식 수술 분야에서 심각한 문제를 구성한다. 이식편의 25%가 기능이 일시적으로 상실될 정도로 팽윤할 것이다. 더욱이, 2-3% 경우에서는, 팽윤이 신장의 파괴를 야기하여 다량 출혈을 일으킨다.

[0510] sHASEGP는 기관 이식체에서 축적된 글리코스아미노글리칸을 분해시키기 위해 이용될 수 있다. 그러한 글리코스아미노글리칸의 제거는 이식편으로부터 물의 제거 및 따라서 기관 기능을 촉진한다. 500-10,000 Units/kg 범위의 투여량이 그러한 사이질 압력을 감소시키기 위해 투여될 수 있다.

[0511] 뇌에서 글리코스아미노글리칸의 병리학적 축적

[0512] 하이알우로난 농도는 많은 뇌척수 병리적 상태에서 증가된다. 뇌척수 하이알우로난의 농도는 보통 성인에서 200 ㎍/L 미만이다 (Laurent et al,ActaNeurol Scand 1996 Sep; 94 (3): 194-206). 이들 농도는 뇌막염, 척추관 협착증, 머리 손상 및 뇌경색과 같은 질병에서 8,000 ㎍/L 이상으로 증가할 수 있다. 따라서 고 시알화된 sHASEGP의 경막내 전달 또는 전신성 주사에 의한 sHASEGP의 투여는 위태롭게 상승된 농도의 기질을 분해하기 위해 이용될 수 있다.

[0513] 뇌에서 효과적인 림프관의 결핍은 또한 머리 손상에 따른 생명을 위협하는 부종을 야기할 수 있다. 하이알우로

난 축적은 HA 신타제에 의한 합성 증가, 및 분해 감소의 결과이다. 하이알우로난의 축적은 백혈구 유출을 촉진하기 위해 손상 조직에서 물 함량을 증가시킬 목적으로 작용할 수 있지만 치명적일 수 있다. 따라서 머리 손상으로 고통받는 환자에게 사람 sHASEGP를 투여하면 조직 하이알우로난 축적 및 이와 연합된 물을 제거할 수 있다. 사람 sHASEGP는 단락을 통해 경막내로 투여되거나, 또는 다르게는 고시알화된 sHASEGP는 정맥내로 투여되어 뇌 조직에 도달할 수 있다.

[0514] 발작에서 일어나는 것과 같은 뇌의 허혈에 이어, 하이알우로난 함량은 HA 신타제의 발현 증가 및 대사 감소로 인해 극적으로 증가한다. 이온 펌프의 불능 및 사이질로의 혈장의 누수는 유체 보유를 야기하며, 이것은 림프관에 의해 적절히 제거되지 않으면 조직 괴사를 야기한다. 일부 그룹은 혈관 투과성을 차단함으로써 허혈 재관류에 이은 사이질 유체 축적을 방지하기 위한 시도를 하였다. 하지만, 일단 유체가 유출되면, 혈관 투과성 방지는 부종의 용해를 막고 상태를 악화시킬 수 있다.

[0515] 사람 sHASEGP는 또한 뇌 종양과 관련된, 특히 아교모세포종 다형태와 관련된 부종의 치료에 이용될 수 있다. 뇌 종양과 관련된 부종은 종양에 이웃한 뇌의 비암종 부분에서 하이알우로난의 축적으로 생긴다. 하이알우로난 축적 부위에 하이알우로니다제의 투여(예, 정맥내 주사 또는 단락을 통해)는 이들 부위에서 과다한 하이알우로난을 분해시켜 그러한 종양과 관련된 부종을 경감시킬 수 있다. 따라서, 하이알우로니다제는 종양 덩어리의 감소 및 종양 성장 및/또는 전이의 억제에서 뇌 종양의 치료에서 성공적일뿐만아니라, 종양과 관련된 부종을 완화시키는 데도 유용하다. 사람 sHASEGP는 부종을 치료하기 위해 소 고환 하이알우로니다제를 투여하기 위한 것과 유사한 방식으로 부종의 치료를 위해 투여될 수 있다 (예, Sa Earp Arq. Braz. Med. 44: 217- 20).

[0516] 심장혈관 질병에서 글리코스아미노글리칸 축적의 치료

[0517] 실험적 심근경색 후 동물 모델에서 하이알우로니다제의 투여는 경색 크기를 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다 (Maclean, et. al Science 1976 Oct 8; 194 (4261): 199-200). 소 하이알우로니다제가 동물에서 경색 크기를 감소시키는 제안된 기작은 허혈 재관류 후 발생하는 하이알우로난 축적을 감소시키는 것이다. 경색 크기의 감소는 림프 배출 증가 및 조직 산소섭취 증가 및 심장근육 물 함량의 감소로부터 발생하는 것으로 생각된다. 경색 크기 감소가 동물 모델에서는 얻어질 수 있었지만, 그 효과는 사람에서 보다 큰 임상 연구에서는 실현되지 않았다. 소 고환 하이알우로니다제는 동물 및 사람에서 약 3분의 주목할만한 짧은 혈청 반감기를 보유한다 (Wolf, et. al., J Pharmacol Exp Ther 1982 Aug; 222 (2): 331-7.). 이러한 짧은 반감기는 소포체 시스템의 스캐빈저 수용체에 의해 쉽게 인식되는 말단 만노스 잔기로 인한 것이다. 작은 동물은 더 작은 혈관 베드로 인해 하이알우로니다제로부터 효과를 얻을 수 있지만, 반감기가 증가된 효소가 필요하다. 고 시알화된 sHASEGP는 스캐빈저 수용체가 없는 시알화로 인한 보다 우호적인 약동학을 보유한다. 100-200,000 Units/kg 범위의 투여량의 고 시알화된 sHASEGP를 이용하여 허혈 재관류 후의 과다한 하이알우로난의 용해를 촉진하고 경색 크기를 감소시킬 수 있다.

[0518] 고 시알화된 sHASEGP는 또한 동맥경화증으로부터의 심장 플라크를 제한하기 위해 이용될 수 있다. 그러한 플라크는 글리코스아미노글리칸을 축적하며 대식세포 및 거품 세포 부착을 매개한다 (Kolodgie et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Oct 1; 22 (10): 1642-8). 고 시알화된 sHASEGP의 투여는 플라크 형성을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 하이알우로니다제의 반복 투여가 100-100,000 Units/kg 투여량에서 고려될 때, 면역원성 위험이 낮고 반감기가 증가된 사람 재조합 단백질을 이용하면 우수한 플라크 감소를 야기할 것이다.

[0519] 말초 조직 괴사의 치료

[0520] 조직 괴사는 정맥 기능부족으로 인한 많은 질병에서 발생한다. 충분한 산소섭취의 부족은 조직의 재성장을 위한 주요 방해물중 하나이다. 동맥내 하이알우로니다제 치료는 말초 동맥 폐색 질병을 가진 환자에서 임상 상태를 크게 개선시키는 것으로 입증되었다 (Elder et. al, Lancet (1980) 648-649). sHASEGP는 10-200,000 유닛의 투여량으로 일주일에 3-5회 동맥내 주사될 수 있다.

[0521] 마취의 증강

[0522] 도살장-유래 하이알우로니다제는 안과 수술에 앞서 국소 마취에서 눈둘레 차단마취를 위해 흔히 이용된다. 상기 효소의 존재는 추가 차단 마취의 필요를 막으며 아키네시아(눈 운동의 상실)의 개시를 가속시킨다. 눈둘레 및 테논 하부 차단 마취는 안과 수술을 위한 하이알우로니다제의 가장 일반적인 용례이다. Wydase®

의 중단 이후, 복시 및 눈꺼풀처짐 증가의 보고가 눈둘레 차단 마취를 이용하여 보고되었다 (Brown et al J Cataract RefractSurg 1999; 25: 1245-9).

[0523] 와이어스(Wyeth)의 Wydase®

의 중단으로, 소 고환-유래 하이알우로니다제 재료는 이제 혼합제조 약국에 의해 공급된다. 하지만, 즉시 혼합제조된 멸균 생성물을 이용하는 것과 관련하여 몇가지 염려가 있다. http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=9426953-ref#ref. 혼합제조 제제는 FDA-허가 제품이 아니다. 따라서, FDA는 제조 과정의 일관성 또는 품질에 대해 컨트롤할 수 없다.

[0524] 10-500 유닛의 sHASEGP는 직접 5 ml의 2% 리도케인(자일로케인), 5 ml의 0.5% 부피바케인(마르케인) 및 선택적으로 에피네프린 1:200,000과 혼합될 수 있다. sHASEGP는 아키네시아의 개시를 증가시키고 추가 차단 마취의 필요를 제거하기 위해 이용될 수 있다. sHASEGP는 또한 눈꺼풀성형술 및 얼굴 주름제거에서 성형 수술을 위한 아키네시아에 이상적이다. sHASEGP는 또한 항 염증제를 확산시키고 조직 팽윤을 감소시키기 위해 그러한 수술과정 후 이용될 수 있다.

[0525] sHASEGP는 또한 주사 과정동안 불편함을 방지하기 위하여 비카보네이트와 같은 완충 용액과 혼합될 수 있다. sHASEGP는 또한 주사에 필요한 물질의 총 부피를 감소시키고 조직의 팽윤으로 인한 고통을 감소시키기 위해 열창을 위한 마취제와 혼합될 수 있다.

[0526] 안내 압력의 감소

[0527] 백내장 수술후 환자에서 흔히 발생하는 부작용은 안내 압력이 상당히 초기에 그리고 때때로 오랜동안 상승하는 것이다. 그러한 상태는 때때로 심각하며, 특히 녹내장성 시각신경유두 변화를 가진 환자에서 그러하다. 압력 증가는 하이알우론산과 같은 점탄성 제제가 수술동안 안내로 주사되는 경우에 더 심각한 경향이 있지만, 안내 압력은 그러한 제제가 사용되지 않는 경우에도 수술 후 증가될 수 있다. 더욱이, 그러한 압력 증가는 수술동안 추가 의약이 사용되지 않을 때에도 발생할 수 있다. 일부 경우에는, 눈에 점탄성제제를 남겨두는 것이 유익하며, 이것은 종종 더 많은 투여량의 탄산 안히드라제 억제제를 환자에게 제공하는 것이 필요하게 한다. 이들 억제제는 눈에서 정상적으로 분비되는 유체인 눈방수가 섬모체에 의해 형성되는 것을 감소시켜 안내 압력을 낮춘다. 수술후 눈의 압력 증가를 완화시키는 현재의 방법은 베타-아드레날린 차단제, 교감신경흥분제, 축동제, 알파 II 선택제, 탄산 안히드라제 억제제 및 프로스타글란딘제와 같은 다양한 타입의 안약을 포함한다.

[0528] 하이알우론산과 같은 점탄성물을 제거하는 바람직한 방법은 전방 절편 또는 후방 절편 수술동안 또는 그 직후 sHASEGP를 주사하는 것이며, 공지의 다른 투여 방법 또한 가능하다. 하이알우론산 및 sHASEGP가 전방 절편 눈 수술동안 전실내로 주사되어 하이알우론산이 수술 개시동안 스페이서로 작용하게 한다면 그것이 바람직하다. 각막 이식의 일부 경우에는, 각막 이식편을 제자리에 봉합하기 전에 하이알우론산 및 sHASEGP 조합을 안내 구조의 표면에 놓을 수 있다. 이 조합은 또한 망막 또는 유리체 수술과 같은 후방 절편 수술에 사용될 수 있다.

[0529] 일부 경우에는, 수술 마지막에 히론(Healon)™, 비스코트(Viscoat)™ 와 같은 점탄성제제, 또는 다른 공간-차지 물질을 눈의 전실에 남겨두는 것이 좋을 수도 있다. 이것은 안내 내용물이 앞으로 와서 각막의 후방 표면에 대하여 압박하는 경우에 양성 압력 상승에서 특히 그러하다. 만일 이것이 합성 안내 렌즈를 가진 눈에서 발생하면, 각막 내피에의 압력은 세포에의 상당한 손상을 야기할 수 있으며 이어서 각막 팽윤 및 혼탁화가 발생할 수 있으며, 이는 시력 감소와 관련된다. 일반적으로, 환자의 안내 압력이 수술 마지막에 크게 상승되면, 그러한 환자에게는 큰 투여량의 탄산 안히드라제 억제제 및 베타-차단제 및 알파 II 아고니스트와 같은 국소 안약을 제공하여 눈방수 형성을 감소시키고/거나 눈방수 유출을 증가시키는 것이 필요하다. 이들 제제는 모두 상당한 부작용을 가지며, 일부 경우에는, 호흡 곤란, 심장 질환 또는 고혈압과 같은 의학적 상태를 가진 환자에서는 금지된다. 하지만, 이들 상황에서 sHASEGP의 사용은 이들 환자에게 그러한 약을 다량 제공할 필요를 제거할 것이다.

[0530] 더욱이, 기둥 섬유주에는 상당량의 하이알우론산이 있다. sHASEGP는 이것을 분해시키고 따라서 기둥 섬유주를 통한 눈방수의 유출을 개선시킬 것이다. 따라서, 환자의 안내 압력은 감소할 것이다. 메틸셀룰로스(오쿠코트(Ocucoat)®

™ , 예를 들어, 스톨츠 인스트루먼트 컴퍼니에서 시판)와 같은, 백내장 수술에서 스페이서 및/또는 보호제로 사용되는 다른 전실 제제와 sHASEGP의 조합은 또한 기둥 섬유주를 개방시키며, 기둥 섬유주에 존재하는 상당량의 하이알우론산을 분해시켜 보다 많은 눈방수 배출을 허용할 것이므로, 상당한 압력 상승을 방지하는 데 효과적일 것이다.

[0531] 기둥 섬유주로부터 글리코스아미노글리칸의 제거는 또한 개방 각 녹내장을 앓고 있는 개인에서 안내 압력 감소에 유용하다. 사람 sHASEGP는 결막 아래 주사 또는 전실내로 직접 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0532] 신경절 낭

[0533] 신경절 낭(손목 낭, 바이블 낭, 또는 등 힘줄 낭으로도 알려짐)은 손의 가장 일반적인 연성 조직 덩어리이다. 이것은 피부 아래에서 느껴질 수 있는 유체로 채워진 주머니이다. 이것은 대개 손 또는 손목에서 힘줄 집(힘줄을 윤활시키는 내층)에 부착되거나 또는 하부 관절과 연결되지만, 일부는 어떤 구조에도 연결되지 않는다. 이들은 또한 발에서 발생할 수도 있다. 이것은 힘줄 또는 관절의 내층을 덮고 있는 인대가 찢어지거나 내층이 인대 결함으로 탈출하여 피부아래의 융기를 야기하는 경우에 발생한다. 종종 염증이 관련되므로, 염증이 생긴 조직은 돌출 주머니를 채우는 젤리같은 유체를 생산한다. 이들은 낭내에 함유된 점성 유체의 높은 압력으로 인해 바위처럼 단단할 수도 있으며, 종종 뼈 융기로 오해된다.

[0534] sHASEGP는 신경절 낭을 완화시키기 위해 이용될 수 있다. 5-1000 유닛의 sHASEGP를 병변내 주사하고 이어서 미세 주사 흡입하면 수술없이 낭을 제거할 것이다. 코르티코스테로이드는 선택적으로 sHASEGP와 함께 주사될 수도 있다. 일부 환자는 추가 주사가 필요할 수도 있다.

[0535] 점액부종

[0536] 피부의 글리코스아미노글리칸(GAG) 침윤은 갑상샘과다증, 갑상샘저하증, 정강뼈앞점액부종, 공막점액부종, 및 경화부종의 특징이다. 하이알우론산은 상기 모든 상태 및 정상 피부에서 주요 GAG이다. GAG 피부 분포의 조직학적 변이성은 최소이다. 후천성 피부 점액증은 유사한 피부 GAG 분포 및 생화학적 조성을 나타낸다. 섬유아세포 활성의 형태학적 차이는 경화부종 및 공막점액부종의 점액증이 국소 과정을 나타냄을 제안하는 반면, 갑상선 질병의 GAG 침윤은 전신성 기원을 가질 수도 있다. 이들 질환은 국소 및 전신 투여 경로 둘다로부터의 sHASEGP로 완화될 수 있다. 만성 치료의 경우, PEG화된 sHASEGP를 이용할 수 있다.

[0537] sHASEGP의 폐 사용

[0538] 정상 개체로부터의 세기관지폐포 세척(BAL)에서 하이알우로난의 농도는 대개 15 ng/ml 미만이다. 하지만, BAL 농도는 호흡곤란 상태에서 극적으로 증가한다 (Bjermer Br Med J (Clin Res Ed) 1987 Oct 3; 295 (6602): 803-6). 예를 들어, ARDS에서는, 하이알우로난 수준은 500 ng/ml까지 증가할 수 있는 반면, 농부 폐에서는 BAL 농도는 1000 ng/ml을 초과한다 (Hallgren et al Am Rev Respir Dis. 1989 Mar; 139 (3): 682-7), (Larrson et al Chest. 1992 Jan; 101 (1) : 109-14). 폐에서 증가된 하이알우로난은 산소 확산 및 가스 교환 및 활성 호중구 및 대식세포 반응을 방지할 수 있다.

[0539] 하이알우로니다제의 소 제제는 많은 이유로 그러한 상태의 치료에 바람직하지 않다. 먼저, 하이알우로니다제의 도살장 고환-유래 제제는 아크로신과 같은 세린 프로테아제로 오염되는 것으로 알려져 있다. 두번째, 소 효소의 외인성 특성은 환자를 사망하게 할 수도 있는 아나필락시스 반응의 확률을 증가시킨다. 따라서, 재조합 사람 sHASEGP의 매우 정제된 제제를 폐 또는 정맥내 전달에 의해 전달시킬 수 있다. 사람 sHASEGP는 또한 증가된 글리코스아미노글리칸과 관련된 다른 폐 합병증으로 고통받는 환자에게 투여될 수 있으며, 또는 다른 동시 전달되는 분자의 폐에의 전달을 개선하기 위해 투여될 수 있다.

[0540] 본 발명은 이제 하기의 비제한적인 실시예를 참고로 보다 상세히 설명될 것이다.

[0541] [실시예]

[0542] 미세적정 계 하이알우로니다제 분석

[0543] 하기 실시예는 sHASEGP의 하이알우로니다제 활성의 측정을 위한 신속한 분석을 제공한다. 이 분석은 WHO 표준 하이알우로니다제 제제를 사용하여 TRU, IU 또는 NFU에 상관될 수 있다.

[0544] 비오틴화된 하이알우로난 미세적정 분석

[0545] 하이알우로난의 글루쿠론산 잔기의 자유 카르복실기는 비오틴-히드라지드(피어스), 설포 NHS(피어스) 및 1-에틸 디메틸아미노프로필-카르보디이미드(시그마)를 이용한 1 단계 반응으로 비오틴화된다. 이 비오틴화 HA 기질은 두번째 반응에서 96웰 미세적정 플레이트에 공유 결합된다. 효소 반응 완결시, 잔여 기질은 표준 ELISA 플레이트 판독기로 판독할 수 있는 아비딘-퍼옥시다제 반응으로 검출된다. 기질이 미세적정 플레이트에 공유 결합되므로, 비오틴화된 기질의 pH-의존성 치환과 같은 작위적 사항은 발생하지 않는다. 민감성은 배양된 세포 및 생물

샘플로부터 하이알우로니다제 활성을 10% 미만의 분석간 편차로 신속하게 측정하도록 한다.

[0546] a. 프로토콜

[0547] 비오틴화된 HA 기질의 제조

[0548] 100 mg의 HA(시그마 케미컬)를 1 mg/ml의 최종 농도로 0.1 M MES, pH 5.0에 용해시키고 비오틴에 결합시키기 전에 4℃에서 적어도 24시간 동안 용해시켰다. 설포-NHS(피어스, 일리노이주 락포드 소재)를 0.184 mg/ml의 최종 농도로 CSO4 MES 용액에 첨가하였다. 비오틴 히드라지드(피어스)를 100 mM 저장 용액으로서 DMSO에 용해시키고 1 mM의 최종 농도로 CSO4 용액에 첨가하였다. 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르비도디이미드(EDAC)의 저장 용액을 증류수중의 100 mM 저장 용액으로 제조하고 30 mM의 최종 농도로 HA 비오틴 용액에 첨가하였다. 이 용액을 4℃에서 밤새 교반시켰다. 미결합 비오틴과 EDAC를 1000배의 물을 세번 교환하면서 물에 투석시켜 제거하였다. 투석된, 비오틴화 HA(bHA)를 분취하여 몇달간 -20℃에서 저장하였다.

[0549] 설포-NHS를 0.2 mg/ml의 농도의 bHA를 갖는 물에 0.184 mg/ml로 희석시키고 50 ㎕/웰로 96웰 COVALINK-NH 플레이트(NUNC; 뉴저지 플라세르빌 소재)에 피펫팅하였다. EDAC를 물에 0.123 mg/ml로 희석시키고 bHA 용액을 갖는 COVALINK-NH 플레이트에 피펫팅하여 10 ㎍/웰 bHA 및 6.15 ㎍/웰 EDAC의 최종 농도가 되도록 하였다. 플레이트를 4℃에서 밤새 또는 23℃에서 2시간 동안 항온처리하여 비교가능한 결과를 얻었다. 미세적정 플레이트에 bCSO4를 공유적으로 고정시킨 후, 흔들어서 결합 용액을 제거하고 플레이트를 2M NaCl 및 50 mM $MgSO_4$ (완충액 A)를 함유하는 PBS로 세번 세척하였다. 플레이트를 최대 1주일동안 4℃에서 저장할 수 있다.

[0550] 고정된 bHA를 가진 COVALINK-NH 플레이트를 100 ㎕/웰 분석 완충액 - 0.1 M 포르메이트, pH 3.7, 0.1 M NaCl, 1% TRITON X-100 계면활성제, 라이소좀 하이알우로니다제를 위한 5 mM 사카로락톤; 또는 1mM $CaCl_2$ 및 중성 활성 효소를 위한 1 mg/ml 사람 혈청 알부민(ICN)을 갖는 10mM Hepes PH 7.4-로 평형화시켰다. 소 고환 하이알우로니다제(시그마 타입 VI-S)를 1.0 내지 $10^{-6}$ rTRU/웰로 중성 효소 완충액에 희석하고 세벌로 100㎕/웰을 분석하여, "상대적 탁도 감소 유닛"(rTRU)에 대한 효소 활성의 보정을 위한 표준 세트를 생성시켰다. 산활성 하이알우로니다제의 샘플을 1:10 내지 1:130,000으로 라이소좀 분석 완충액에 희석시키고 100 ㎕/웰로 세벌로 피펫팅하였다. 조직 추출물 및 사람 혈장의 대부분의 분석의 경우, 37℃에서 30분 항온처리가 충분하였다. 양성 및 음성 대조군 웰(각각 효소 또는 ABC(하기 참고)가 없음)를 세벌로 포함시켰다.

[0551] 200 ㎕/웰로 6M 구아니딘 HCl을 첨가하고 PBS, 2 M NaCl, 50 mM $MgSO_4$, 0.05% TWEEN 20 계면활성제(완충액 B)를 이용하여 300 ㎕/웰로 3회 세척하여 반응을 종결하였다. 아비딘 비오틴 복합체(ABC) 키트(벡터 랩, 캘리포니아주 벌림엄 소재)를 0.1% TWEEN20 계면활성제를 함유하는 PBS 10ml에서 제조하였으며, 이를 항온처리동안 실온에서 30분동안 예비항온처리하였다. ABC 용액을 첨가하고(100 ㎕/웰) 실온에서 30분동안 항온처리하였다. 플레이트를 완충액 B로 5회 세척하고, 이어서 0.1 M 시트레이트-$PO_4$ 완충액, pH 5.3의 10ml에 OPD 10 mg 정제를 녹이고 7.5 ㎕의 30% $H_2O_2$를 첨가하여 o-페닐렌디아민(OPD) 기질을 100 ㎕/웰로 첨가하였다. 플레이트를 10-15분동안 어두운 곳에서 항온처리하고, 이어서 바이오메탈릭스(뉴저지 프린스턴 소재)로부터의 델타 소프트 II 플레이트 판독기를 이용하여 컴퓨터에 의해 모니터되는 ELISA 플레이트 판독기(Titertek Multiskan PLUS; ICN)에서 492 nm 필터를 이용하여 판독하였다. 시판 하이알우로니다제 제제의 4 파라미터 곡선 핏트에 의해 소 고환 하이알우로니다제를 이용한 표준 곡선을 생성하고, 미지 샘플은 그들의 492 nm에서의 흡광도를 통해 삽입하였다.

[0552] 하이알우로니다제의 pH 의존성을 분석하기 위하여, 정제된 재조합 sHASEGP와 소 고환 하이알우로니다제를 이용한다. 효소 활성의 pH 의존성은 정제된 sHASEGP 또는 부분적으로 정제된 소 고환 하이알우로니다제를 하기 완충액에서 0.1 rTRU로 희석하여 측정한다: 50 mM 포르메이트, pH 3-4.5; 50 mM 아세테이트, pH 5-6; 50 mM MES, pH 6-7; 또는 50 mM HEPES, pH 7-8. 샘플은 37℃에서 30분간 분석하고 활성은 최대 활성의 퍼센트로 표현하였다. NaCl은 고환 하이알우로니다제 제제의 최적 pH를 변화시킬 수 있으므로, 완충액에 이용되지 않았으며(Gold, Biochem. J. 205: 69-74,1982; Gacesa et al. Biochem. Soc. Trans. 7: 1287-1289, 1979); 생리학적 염 농도(0.15 M)는 겉보기 pH 최적값을 감소시키며, 이 효과는 원래의 조 샘플에서보다 고환 효소의 정제 제제에서 더욱 심하였다.

[0553] b. 결과

[0554] 하이알우로난은 비오틴-히드라지드와 EDAC를 이용하는 1 단계 반응으로 비오틴화되었다. HA상의 자유 카르복실기를 비오틴 히드라지드와 결합시키는 EDAC를 제한함으로써, HA상의 전체 글루쿠론산 잔기의 작은 분획만이 표

지되었다. HA(2.8 X $10^{-3}$ M)에 첨가된 EDAC의 이 양(3 X $10^{-5}$ M)은 HA의 93 이당류 단위 당 최대 한 분자의 비오틴 히드라지드가 결합하도록 한다.

[0555] pH 3.7에서 측정되고 1.0 내지 1 X $10^{-6}$ TRU/웰로 희석된 소 고환 하이알우로니다제 표준 반응의 4-파라미터 곡선 피트를 준비하였다. 4 파라미터 곡선 피트는 식 y= ((A-D)/(1+(conc/C)^B)) + D)으로부터 확립되었으며, 이때 $\log_{it}$ y= ln (y'/1-y'), y'= (y-D)/(A-D), B=-b/ln 10 및 C=EXP(a/B)이다. 4 파라미터(A,B,C,D)는 선형 회귀를 이용한 2+2 알고리즘을 이용하는 소프트웨어 프로그램으로 계산되었다 (Rodbard et al., Clin. Chem. 22: 350,1976).이 곡선 피트는 표준 곡선에 S자 모양을 포함시킨다. 샘플 측정을 위한 적절한 정확성은 일반적으로 30분 항온처리동안 0.001 내지 0.01 TRU/웰로 발생한다.60분 항온처리동안, TRU의 1/1000이 검출가능하다. 표준 로그 곡선 또한 보다 짧은 범위의 값에 걸쳐 이용되어 표준 곡선 피트를 확립할 수 있다. 본 발명은 특정 바람직한 구체예에 관하여 개시되었지만, 본 발명은 그러한 특정 구체예로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.

[0556] 실시예 2

[0557] sHASEGP cDNA의 클로닝

[0558] 사람 sHASEGP를 암호하는 핵산은 인공 유전자 합성, RT-PCR, 및 cDNA 라이브러리 하이브리드화를 비롯한 많은 과정을 통해 당업자가 쉽게 얻을 수 있다 (예를 들어, Gmachl et al FEBS 336 (3) 1993, Kimmel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1993 10071-10075 참고). 다르게는, 사람 sHASEGP를 암호하는 클론은 IMAGE 또는 다른 사람 유전자 서열의 공급체(인비트로겐 클론 ID IOH10647)로부터 얻을 수 있다.

[0559] 전체-길이 사람 PH20 cDNA는 2009 뉴클레오티드 길이이며 1530 뉴클레오티드의 개방 판독 프레임을 함유하였다. 5' UTR은 특이하게 크며, 이것은 보유된 인트론을 나타낼 수 있으며, 5' UTR의 9개의 비 암호 개시 코돈으로 인해 리보좀이 정확한 개시 메티오닌 코돈에 결합하는 것을 방해하여 번역을 억제할 수 있다. 단백질(젠뱅크 기탁번호 NP_003108)은 서열 번호 1의 509 아미노산을 포함하며 58 kDa의 계산 분자량을 갖는다.

[0560] 클론의 서열 결정의 경우, PCR 증폭된 밴드를 잘라내고, 젤 추출 키트(퀴아젠)를 이용하여 용출시키고, 제한 분해 후 양립성 말단을 갖는 적절한 벡터내로 클론시킨다. 모든 서열 결정 반응은 Taq 염료 데옥시 종결자 사이클 서열결정 키트(어플라이드 바이오시스템즈)를 제조자의 지시에 따라 이용하여 이중쇄 DNA에서 실시되며, ABI Prism™ 자동화 서열결정기(어플라이드 바이오시스템즈)에서 실시된다.

[0561] 사람 PH-20 개방 판독 프레임은 서열 번호 14 및 47의 프라이머를 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 사람 고환 cDNA 라이브러리(클론테크, 캘리포니아주 팔로 알토 소재)를 증폭시켜 얻어졌다. PCR 생성물을 Nhel 및 BamHI으로 분해하고 벡터 IRESpuro2(클론테크)의 Nhel 및 BamHI 부위내로 클론시켰다.

[0562] 실시예 4

[0563] 사람 PH20 cDNA로부터 sHASEGP의 분리

[0564] 포유류 세포에서 효과적인 당화를 일으킬 수 있는 촉매 활성의 분비 재조합 사람 sHASEGP 발현 벡터를 후술하는 대로 생성하였다. 또한 sHASEGP를 생성할 수 있는 효모 및 곤충 세포와 같은 다른 종을 위한 프로모터와 선별 유전자를 가진 다른 발현 구조체가 고려된다. 글루타민 신타제 또는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR)과 같은 양성 선별 유전자 또한 이용될 수 있다. 하기에 주어진 예는 이용될 수 있는 몇 가지 플라스미드 발현 시스템의 예로서 제공된다.

[0565] sHASEGP의 분비된 형태를 구성하기 위하여, 소수성 C 말단이 없는 절단 돌연변이를 구성하였다. GPI 절단 예측 프로그램을 이용하여, 전체-길이 GPI-고정된 단백질에서 아미노산 위치 N483 주위에서 GPI 고정 절단 부위를 찾았다. 7개의 네스티드(nested) 3' 프라이머 세트를 이용하여, 위치 Y482에서 시작하는 예측된 GPI 고정부가 없으며 한 아미노산씩 점차 결실되는 7개의 절단된 결실 돌연변이 세트를 구성하였다. 이들 프라이머는, 3' 프라이머에서 중지 코돈으로 태그되지 않거나, 또는 정제 및 검출의 용이성을 위해 C 말단 His 태그된 단백질로서 절단 돌연변이를 벡터 Irespuro2에 클론시키기 위해 양립성 Nhe1(5') 및 BamH1(3') 부위를 갖도록 고안되었다. 예를 들어, 역 프라이머 서열 번호 8, 9 및 10을 이용하여 6 His 태그없이 위치 Y 482, F481, 및 I480에서 끝나는 결실 돌연변이를 생성하였다. 다른 돌연변이 프라이머는 특정 아미노산을 포함시키고 배제시키기 위한 적절한 변형을 가지고 동일한 염기 고안을 이용하여 생성되었다. His-태그된 변이체의 생성을 위하여, 프라이머가 각 역방 프라이머에서는 중지 코돈이 결핍되고 전방 프라이머는 그대로 남아 있는 것을 제외하고는, 태그되지않은 변이체를 위한 것과 동일한 프라이머 세트를 이용한다 (His 태그된 구성체의 경우, 서열 번호 19, 20, 21,

22, 23, 24 및 25를 가지며, 그들의 각 구성체를 위한 태그되지않은 역방 프라이머에 해당하는 중지 코돈이 없는 역방 프라이머인 프라이머를 말함). 중복 프라이머를 이용하여 Irespuro2 벡터의 BamH1 및 Not1 부위내의 헥사히스티딘이 후속되는 6 아미노산 스페이서를 구성하여, PCR 증폭되고 제한 분해된 생성물을 his 태그 함유 Irespuro2 벡터의 Nhe1(5') 및 BamH1 부위내에 결찰시켜 His-태그된 돌연변이가 생성되도록 하였다.

[0566] 사람 sHASEGP가 그 카르복시 말단에서 변형되어 분비되고 중성 활성인 효소를 생성할 수 있는지를 확인하기 위하여, 벌 독소 효소와의 상동성에 기초하여, GPI 앵커 부착 부위로부터 예측된 "촉매 도메인"까지 연속적인 절단을 만들었다.

[0567] IRESPuro2내의 사람 sHASEGP 전체-길이 GPI 고정된 클론을 암호하는 DNA를 주형으로 이용하여 다양한 절단된 결실 돌연변이를 생성하였다. 소프트웨어 모델링 프로그램에 의해 전체-길이 폴리펩티드를 위한 몇 가지 예측 절단 부위를 얻었다. 그러한 예측 부위 중 하나는 아미노산 위치 N483(서열 번호 1)이었다. PCR 프라이머는 N483으로부터 단백질을 연속하여 절단시켜 Y482(N 결핍)에서 시작하여 E477(P 결핍)에서 끝나는 6 결실 돌연변이를 생성하도록 고안되었다.

[0568] a. 프로토콜

[0569] N483이 결핍된 절단 돌연변이 생성:

[0570] pIRESPuro2의 Nhe1 및 BamH1 부위 사이의 전체-길이 GPI 고정된 sHASEGP 클론을 주형으로 이용하였다. 이 주형을 M1의 천연 시그널 펩티드의 개시 메티오닌에서 시작하는 NheI 부위를 함유하는 5' 프라이머(서열 번호 14), 및 Y 482에서 끝나는 BamHI 부위를 함유하는 3' 프라이머(서열 번호 8)로 증폭시켰다. PCR 생성물을 1% 아가로즈 젤에서 러닝시켜 분리하고 정확한 크기의 증폭 밴드를 확인하고, 젤 정제하고, NheI 및 BamHI으로 제한 분해하고 NheI 및 BamHI 부위 사이에서 벡터 pIRESPuro2(클론테크)내로 클로닝시켜 아미노산 위치 N482에서 끝나며 아미노산 서열(Y482까지 sHASEGP의 생성 폴리펩티드의 서열을 위해서는 서열 번호 5) 및 뉴클레오티드 서열(서열 번호 48- 서열 번호 5의 폴리펩티드를 위한 암호 뉴클레오티드)를 가지며 GPI 앵커가 결핍된 sHASEGP의 절단 돌연변이를 발현시킬 발현 벡터를 생성하였다.

[0571] Y 482, F 481, I 480, Q 479, 및 P 478이 각각 결핍된 다른 절단 돌연변이의 생성.

[0572] 각 돌연변이를 위해 적절한 3' 프라이머를 이용한 차이만을 가지고 동일한 전략을 이용하였다. 각 3' 프라이머는 하기와 같다:

[0573] Y 482가 결핍된 sHASEGP 돌연변이를 위한 3' 프라이머 - 서열 번호 9

[0574] F 481이 결핍된 돌연변이를 위한 3' 프라이머 - 서열 번호 10

[0575] I 480이 결핍된 돌연변이를 위한 3' 프라이머 - 서열 번호 11

[0576] Q 479가 결핍된 돌연변이를 위한 3' 프라이머 - 서열 번호 12

[0577] P 478이 결핍된 돌연변이를 위한 3' 프라이머 - 서열 번호 13

[0578] sHASEGP의 최소 활성 도메인을 결정하기 위한 추가 결실 돌연변이의 생성:

[0579] 10 내지 20 아미노산 블록의 추가 결실을, E477까지의 sHASEGP인 sHASEGP의 가장안쪽의 중성 pH 활성 절단 돌연변이의 3' 말단으로부터 만들었다. NheI 전방 프라이머(서열 번호 14)를 적절히 위치된 3' 프라이머와 이용하여 카르복시 말단으로부터 원하는 길이의 sHASEGP의 결실 돌연변이를 PCR 증폭시켰다. 예를 들어, 각각 5' 및 3' 프라이머로서 서열 번호 14 및 26에 개시된 프라이머를 이용하는 PCR을 이용하여 IRESPuro2 벡터의 발현 구조체로부터 발현될 때 서열 번호 49의 폴리펩티드를 생성하였다. 유사하게, 서열 번호 27, 28, 29, 30, 31 및 32에 개시된 역방 3' 프라이머를 이용한 PCR을 이용하여, 각각 성숙 sHASEGP의 아미노산 위치 A 447, S 430, G 413, S 394, A 372, 및 S 347에서 끝나는 결실 돌연변이를 생성하였다. 각 경우에 PCR 생성물은 NheI 및 BamHI 효소로 절단하였으며 절단된 생성물은 NheI 및 BamHI 부위 사이에서 pIRESPuro2 벡터내로 클론시켰다. 각 그룹으로부터의 최종 발현 구조체에서 몇몇 독립적인 클론을, CD-CHO 무혈청 배지(인비트로겐, 캘리포니아주)중의 CHO 세포 및 분석을 위해 표시된 시점에서 취한 샘플에서의 일시적 형질감염에 의해, 분비된 중성 활성 sHASEGP 활성에 대해 시험하였다. 밤샘 배양물에서 준비한 미니프렙 DNA를 제조자의 추천 프로토콜에 따라 진쥬스(노바겐, 캘리포니아주 소재) 형질감염 시약으로 형질감염시켰다. 하이알우로니다제 활성을 전술한 대로 미세적정 분석에 의해 측정하였다.

[0580] b. 결과

[0581] 하이알우로니다제 활성을 sHASEGP 절단 돌연변이에서 측정하여 분비된 중성 활성 하이알우로니다제 활성을 위한 최소 활성 도메인을 확인하였다.

| 아미노산 1 내지 : | U/ML/24HRS PH7.4 |
|---|---|
| 347 | 0.000 |
| 372 | 0.000 |
| 394 | 0.000 |
| 413 | 0.000 |
| 430 | 0.000 |
| 447 | 0.000 |
| 467 | 0.089 |
| 477 | 0.567 |
| 478 | 0.692 |
| 479 | 0.750 |
| 480 | 0.575 |
| 481 | 0.740 |
| 482 | 0.329 |
| 483 | 0.800 |
| 509 | 0.044 |

[0582]

[0583] 상기 결과는 아미노산 Y482 내지 E477에서 끝나는 모든 여섯 개의 1 아미노산 결실 돌연변이가 GPI 고정된 sHASEGP보다 더 높은 분비 활성을 제공함을 보여주었다.

[0584] 상기 결과는 또한 A467을 넘는 결실은 분비 활성을 제거함을 보여주었다. A467 클론으로부터의 분비된 중성 활성은 P478 또는 N483 클론에서 발견되는 것의 약 10%로 감소하였다. 따라서 벌 독소 효소로부터 이전에 추정된 것보다 사람 sHASEGP의 더 많은 카르복시 말단 도메인 이중성 활성  하이알우로니다제 도메인 생성에 필요함을 보여준다. 따라서 카르복시 말단 도메인의 시스테인이 중성 활성에 필요하다. N483에서의 GPI 절단 부위전에 약 10 아미노산에 걸친 매우 좁은 범위가 최소 활성 도메인을 정의하였다.

[0585] 실시예 5 - sHASEGP 분비 활성에 대한 시그널 펩티드 변형의 효과.

[0586] 사람 sHASEGP는 특이하게 긴 예측된 천연 리더 펩티드를 보유한다. 부가적으로는, 리더 펩티드에서 두 이웃한 시스테인 잔기의 존재는 고 수준 발현동안 소포체내에서 폴리펩티드 다량체의 응집을 야기하여 sHASEGP의 고 수준 발현을 방지할 수 있다. 따라서 보다 효율적인 분비 리더 펩티드의 시리즈를, 그들이 분비를 위해 sHASEGP를 표적화하는 것을 증가시키는 능력에 대해 검사하기 위하여 시험하였다.

[0587] a. 프로토콜

[0588] 카파 리더 펩티드는 중복 프라이머 어닐링 및, 서열 번호 37,38,39 및 40의 서열에 해당하는 프라이머를 이용한 연장 PCR에 의해 구성하였다. 생성된 PCR 증폭 카파 서열을 5' 말단에서의 NheI 부위(서열 번호 41에 개시) 및 3' 말단에서의 EcoRI 부위(서열 번호 42 에 개시)를 함유하는 인접 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 이에 의해 카파 리더 펩티드(폴리펩티드 서열은 서열 번호 43에 개시됨)를 NheI 및 EcoRI 부위 사이에서 리트머스(Litmus) 39(NEB) 벡터에 클로닝하였다. sHASEGP는 내부 EcoRI 부위를 가지며; 따라서 NheI 및 EcoRI 부위 사이의 이 카파 구조체는 5' SpeI 프라이머(서열 번호 44에 개시됨) 및 3' MluI 프라이머(서열 번호 45에 개시됨)로 추가 증폭되었다. P478에서 끝나는 GPI 앵커없는 sHASEGP를 NheI 및 BamHI으로 pIresPuro2로부터 절단하고, 리트머스 39 벡터의 NheI 및 BamHI 부위내에서 리트머스39(NEB) 벡터내로 클로닝시켰다. 이렇게 얻어진 sHASEGP-함유 리트머스 벡터를 SpeI 및 MluI 제한 효소로 분해하고 SpeI 및 MluI로 증폭된 카파 리더 구조체를 그안에 클로닝시켰다. 카파 및 sHASEGP 서열 둘다를 함유하는 이 리트머스 39 벡터에서 부위 지시된 돌연변이유발을 실시하여 카파 리더 서열을 sHASEGP의 성숙 폴리펩티드에 인프레임으로 융합시켰다. 서열 번호 34 및 35에 해당하는 프라이머 쌍을 이용하여 sHASEGP(최대 P478까지)의 F38에 융합된 말단 아미노산으로 천연 Asp를 갖는 카파 리더를 생성하였다 (융합 단백질의 폴리펩티드 서열을 위해서는 서열 번호 46에 개시됨). 서열 번호 35와 서열 번호 33에 의해 구현된 것과 같은 다른 프라이머쌍 조합을 이용하여, sHASEGP의 L36에 융합된 말단 Asp(D)에서 끝나는

카파 리더를 생성시키고, 서열 번호 36과 서열 번호 33을 이용하여 sHASEGP의 L36에 융합된 Gly(G)(말단 Asp(D) 앞)에서 끝나는 카파 리더를 생성시키고, 서열 번호 36과 서열 번호 34를 이용하여 sHASEGPDML F38에 융합된 Gly(G)(말단 Asp(D) 앞)에서 끝나는 카파 리더를 생성시켰다. 부위 지시된 돌연변이유발에 의해 얻어진 카파-sHASEGP 융합체를 젤 정제하고, 효소 DpnI로 분해하여 임의의 모 DNA를 분해시키고, 이어서 NheI 및 BamHI으로 분해시키고 pIRESPuro2 벡터내의 BamHI과 NotI 부위 사이에 클론된 his 태그(6 히스티딘이 후속되는 6 아미노산 스페이서)를 갖는 NheI/BamHI 분해된 HisIresPuro2 백본에 클론시켰다. 따라서 결찰시, pIresPuro2내의 NheI-카파-sHASEGP-BamHI-His인 구조체를 얻는다. 카파 리더 말단에서 G 또는 D 및 성숙 sHASEGP의 시작에서 L36 또는 F38의 조합에 해당하는 그러한 구조체 4 세트를 얻었다. 각 타입의 구조체로부터의 몇가지 독립적인 클론을 CD-CHO 배지(인비트로겐, 캘리포니아주)에서 CHO 세포내로 형질감염시켜 카파 분비 리더의 존재가 천연 분비 리더에 비하여 분비된 단백질의 수준 증가를 촉진하는지를 시험하였다. 밤샘 배양물로부터 제조된 미니프렙 DNA를 제조자의 추천 프로토콜에 따라 진쥬스(노바겐, 캘리포니아주) 형질감염 시약으로 형질감염시키고 지정된 시점에서 미세적정 분석에 의한 시험을 위해 샘플을 취하였다. 하이알우로니다제 활성을 전술한 대로 미세적정 분석에 의해 측정하였다.

[0589] 보다 고 농도의 분비된 중성 활성 sHASEGP 활성에 대해 시험하기 위하여 마우스 IgG 카파쇄 리더 펩티드 sHASEGP 융합 구조체를 시험하였다.

[0590] b. 결과

[0591]

| 사람 sHASEGP 유전자 구조체 | | U/ML/24HOURS PH 7.4 |
|---|---|---|
| IgG 카파 리더 | sHASEGP AA 38-478 HIS6 | 3.0257 |
| 천연 리더 | sHASEGP AA 1-478 HIS6 | 0.4857 |

[0592] 효소 분석 결과는 IgG 카파 리더가 그러한 리더가 결핍된 클론 P478, Y 482 또는 N 483과 비교할 때 천연 분비 리더보다 약 7 내지 8배 더 높게 sHASEGP의 분비를 증가시킬 수 있음을 나타냈다. 카파 리더의 Asp 또는 Gly에서 sHASEGP의 L36 또는 F38로의 리더 융합 부위의 변화를 갖는 다른 카파 리더 구조체는 분비된 중성 활성 하이알우로니다제 활성의 농도 증가를 일으켰다. 다른 효과적인 분비 리더 서열이 동일한 기법으로 사용될 수 있으므로, 이들 예는 본 발명의 범위를 제한하기 보다는 확장함을 의도한다.

[0593] 실시예 6

[0594] 사람 sHASEGP 발현 벡터의 생성

[0595] 에피토프 태그가 없는 sHASEGP를 바이시스트론 발현 카세트, HZ224(서열 번호 47)내로 클로닝시켜 생성시켰다. sHASEGP의 발현을 위한 HZ24 플라스미드 벡터는 pCI 벡터 백본(프로메가), 사람 PH20 하이알우로니다제의 아미노산 1-482를 암호하는 DNA 서열, ECMV 바이러스(클론테크)로부터의 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 및 마우스 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자를 포함한다. pCI 벡터 백본은 또한 베타-락타마제 내성 유전자(AmpR) 암호 DNA, f1 복제 기원, 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 인핸서/프로모터 영역(CMV), 키메라 인트론, 및 SV40 후기 폴리아데닐화 시그널(SV40)를 포함한다. sHASEGP 구조체를 암호하는 DNA는 천연 시그널 리더의 메티오닌에서 코작 컨센서스 서열 및 티로신 482에서 중지 코돈을 함유하였다. 생성된 구조체 pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24)는 내부 리보솜 진입 부위에 의해 분리된 PH20의 아미노산 1-482 및 디하이드로폴레이트 리덕타제의 아미노산 1-187을 암호하는, CMV 프로모터에 의해 구동되는 단일 mRNA 종을 생성한다.

[0596] 사람 PH20 개방 판독 프레임을 PH20의 메티오닌앞에 NheI 부위와 코작 컨센서스 서열을 도입하는 5' 프라이머와 티로신 482 뒤에 중지 코돈을 도입하고 BamHI 제한 부위를 도입하는 역방 프라이머를 이용하여 인비트로겐 ORF 클론(IOH10647, 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재)으로부터 증폭시켰다. NheI 및 BamHI으로 PH20 PCR 단편을 분해한 후, 생성된 PCR 생성물을 플라스미드 pIRESpuro2(클론테크, 캘리포니아주 팔로 알토 소재)내로 결찰시켰다.

[0597] 실시예 7

[0598] sHASEGP 발현 세포주의 생성

[0599] 4 mM 글루타민 및 18 ml 플루리오닉(Plurionic) F68/L(깁코)로 보충된, DHFR(-) 세포를 위한 GIBCO 변형된 CD-CHO 배지에서 성장하는 비-형질감염 DG44 CHO 세포를 형질감염 준비로 쉐이커 플라스크에 0.5 X $10^6$ 세포/ml로

접종하였다. 120 rpm으로 교반하면서 5% $CO_2$ 가습된 항온처리기에서 37℃에서 세포를 성장시켰다. 지수적으로 성장하는 비-형질감염 DG44 CHO 세포를 형질감염에 앞서 생존성에 대해 시험하였다.

[0600] 비-형질감염 DG44 CHO 세포 배양물의 60,000,000 생존 세포를 침전시키고 2X 형질감염 완충액(2X HeBS = 40 mM Hepes, pH 7.0, 274 mM NaC1, 10 mM KC1, 1.4 mM $Na_2HPO_4$, 12 mM 덱스트로스) 0.7 mL에서 20,000,000 세포의 밀도로 재현탁시켰다. 재현탁 세포의 각 분취액에, 선형 HZ24 플라스미드(250 ㎍) 0.09 mL을 첨가하고, 세포/DNA 용액을 실온의 0.4 cm 갭 BTX(젠트로닉스) 전기천공 큐벳내로 옮겼다. 음성 대조군 전기천공을 플라스미드 DNA가 혼합되지 않은 세포로 실시하였다. 세포/플라스미드 혼합물을 330 V와 960 uF 또는 350 V와 960 uF의 축전지 방전으로 전기천공시켰다.

[0601] 전기천공 후 큐벳으로부터 세포를 제거하고 4 mM 글루타민 및 18 ml 플루리오닉 F68/L(깁코)로 보충된, DHFR(-) 세포를 위한 GIBCO 변형된 CD-CHO 배지 5 mL내로 옮기고, 5% $CO_2$ 가습된 항온처리기에서 37℃에서 2일동안 선별없이 6-웰 조직 배양 플레이트의 웰에서 성장시켰다.

[0602] 전기천공 후 2일째에, 0.5 mL의 조직 배양 배지를 각 웰로부터 제거하여 하이알우로니다제 활성의 존재에 대해 시험하였다.

[0603] 형질감염 후 40시간에 HZ24 형질감염된 DG44 CHO 세포의 초기 하이알우로니다제 활성

[0604]

| | 희석 | 활성 Units/ml |
|---|---|---|
| 형질감염 1 330V | 1 내지 10 | 0.25 |
| 형질감염 2 350V | 1 내지 10 | 0.52 |
| 음성 대조구 | 1 내지 10 | 0.015 |

[0605] 형질감염 2(350 V)로부터의 세포를 조직 배양 웰로부터 수집하고, 계수하고 mL 당 10,000 내지 20,000 생존 세포로 희석하였다. 세포 현탁액의 0.1 mL 분취액을 다섯 개의 96-웰 둥근 바닥 조직 배양 플레이트의 각 웰로 옮겼다. 4 mM 글루타막스-1을 함유하며 하이포잔틴 및 티미딘 보충물이 없는 CD-CHO(깁코) 0.1 mL을 세포를 함유하는 웰에 첨가하였다 (최종 부피 0.2 mL).

[0606] 10개의 클론을 메토트렉세이트없이 성장시킨 5 개의 플레이트로부터 확인하였다.

[0607]

| 플레이트/웰 ID | 상대적 히아루로니다제 활성 |
|---|---|
| 1C3 | 261 |
| 2C2 | 261 |
| 3D3 | 261 |
| 3E5 | 243 |
| 3C6 | 174 |
| 2G8 | 103 |
| 1B9 | 304 |
| 2D9 | 273 |
| 4D10 | 302 |
| 1E11 | 242 |
| A1 (+) 대조구 | 333 |
| H12 (-) 대조구 | 0 |

[0608]

[0609] 6개의 HZ24 클론을 배양시키고 단일 세포 현탁액으로서 쉐이커 플라스크로 옮겼다. 클론 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, 및 4D10을 2차원 무한 희석 전략을 이용하여 96-웰 둥근 바닥 조직 배양 플레이트에 도말하였다. 희석된 클론을 웰 당 500 비-형질감염 DG44 CHO 세포의 배경에서 성장시켜, 배양 초기동안 필요한 성장 인자를 제공하였다. 서브클론 당 10개의 플레이트를 만들었다.

[0610] 클론 3D3은 24 개의 가시적인 서브클론을 생산하였다. 24개의 서브클론중 8개로부터의 상등액에서 상당한 하이알우로니다제 활성이 측정되었으며(> 50 Units/mL), 이들 8개의 서브클론을 50 nM 메토트렉세이트의 존재하에서 T-25 조직 배양 플라스크내로 확장시켰다. 클론 3D3 50 nM을 500 nM 메토트렉세이트에서 추가 확장시켜 쉐이커 플라스크에서 1,000 Units/ml 넘게 생산하는 클론을 얻었다 (클론 3D3 5M).

[0611] 실시예 8

[0612] sHASEGP의 생산

[0613] 3D3 5M의 바이알을 해동시키고 100 nM 메토트렉세이트와 글루타맥스(인비트로겐)로 보충된 CHO CDM(인비트로겐, 캘리포니아주 칼스배드 소재)에서 1L 스피너 플라스크를 통하여 T 플라스크로부터 확장시켰다. 세포를 ml 당 4.0 x 10E5 생존 세포의 접종 밀도로 스피너 플라스크로부터 5 L 생물반응기(브라운)로 옮겼다. 파라미터는 온도 고정점, 37℃, pH 7.2(시작 고정점)이었으며, 용해 산소 고정점 25% 및 0-100 cc/분의 공기 오버레이였다. 168 시간에, 250 ml의 공급 #1 배지(CD CHO + 50 g/L 글루코스)를 첨가하였다. 216 시간에, 250 ml의 공급 #2 배지(CD CHO + 50 g/L 글루코스 + 10 mM 소듐 부티레이트)를 첨가하고, 264시간에 250 ml의 공급 #2 배지를 첨가하였다. 이 과정에 의해 6백만 세포/ml의 최대 세포 밀도에서 1600 Units/ml의 최종 생산성이 얻어졌다. 소듐 부티레이트의 첨가는 생산의 최종 단계에서 sHASEGP의 생산을 극적으로 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0614] 3D3-5M 성장 및 sHASEGP 생산, 5L 생물반응기

[0615]

| 실시 시간 | 생존 세포 x10E5 | % 생존 | Units/ml | Vol (mL) | [글루코스] | 공 급 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 4.4 | 100 | 0 | 4500 | 547 | |
| 24 | 5.7 | 100 | 0 | 4500 | 536 | |
| 48 | 10.1 | 100 | 37 | 4500 | 501 | |
| 72 | 17.1 | 99 | 62 | 4500 | 421 | |
| 96 | 28.6 | 99 | 118 | 4500 | 325 | |
| 120 | 28.8 | 99 | 240 | 4500 | 274 | |
| 144 | 60.2 | 100 | 423 | 4500 | 161 | |
| 168 | 55 | 100 | 478 | 4500 | 92 | 250ml 공급 #1 |
| 192 | 66.6 | 98 | 512 | 4750 | 370 | |
| 216 | 55.2 | 92 | 610 | 4750 | 573 | 250ml 공급 #2 |
| 240 | *53* | *88* | 710 | 5000 | *573* | |
| 264 | 49.8 | 84 | 852 | 5000 | 474 | 250ml 공급 #2 |
| 288 | 40 | 70 | 985 | 5250 | 770 | |
| 312 | 31 | 61 | 1467 | 5250 | 773 | |
| 336 | 25.4 | 52 | 1676 | 5250 | 690 | |

[0616] 실시예 9

[0617] sHASEGP의 정제

[0618] 3D3 클론으로부터의 조절된 배지를 깊이 여과에 의해 깨끗이 하고 10 mM Hepes pH 7.0 으로 접선 유동 정용여과시켰다. 가용성 sHASEGP를 이어서 Q 세파로즈(파마시아) 이온 교환, 페닐 세파로즈(파마시아) 소수성 상호작용 크로마토그래피, 페닐 보로네이트(프로메틱스) 및 히드록스아파타이트 크로마토그래피(바이오래드, 캘리포니아주 리치몬도 소재)에서 순차적으로 크로마토그래피시켜 정제하였다.

[0619] Q 세파로즈에 결합된 sHASEGP를 동일한 완충액에서 400 mM NaCl에서 용출시켰다. 용출물을 500 mM ASO4의 최종 농도로 2M 암모늄 설페이트로 희석시키고, 페닐 세파로즈(저 서브) 컬럼을 통과시키고, 이어서 동일한 조건하에서 페닐 보로네이트 수지에 결합시켰다. sHASEGP를 ASO4없는 50 mM 비신에서 pH 9.0에서 세척 한 후 Hepes pH 6.9에서 페닐 세파로즈 수지로부터 용출시켰다. 용출물을 5 mM $PO_4$ 1 mM $CaCl_2$에서 pH 6.9에서 세라믹 하이드록시아파타이트상에 부하하고 0.1 mM $CaCl_2$를 갖는 80 mM $PO_4$ pH 7.4로 용출시켰다.

[0620] 얻어진 정제된 sHASEGP는 USP 참고 표준을 이용하는 미세탁도 분석에 의해 65,000 USP Units/mg 단백질을 초과하는 비활성을 보유하였다. 정제된 sHASEGP는 0.1 % TFA/$H_2O$ 및 0.1% TFA/90% 아세토니트릴/10% $H_2O$ 사이의 구배를 이용하는 파마시아 5RPC 스티렌 디비닐벤젠 컬럼으로부터 24 내지 26분에서 단일 피크로 용출되었으며, PNG아제-F로 처리시 날카로운 51 kDa 밴드로 감소되는, SDS 전기영동에 의해 61 kDa의 단일 광 밴드로 분리되었다. N-말단 아미노산 서열결정 결과 리더 펩티드가 효과적으로 제거되었음이 나타났다.

[0621] 생화학적으로 정제된 sHASEGP의 N-말단 아미노산 서열

| 위 치 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 이 론 | Leu | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn |
| 관 찰 | - | Asn | Phe | Arg | Ala | Pro | Pro | Val | Ile | Pro | Asn |

[0622]

[0623] 실시예 10

[0624] DG44 CHO-유래 sHASEGP 당화의 분석

[0625] 다른 종으로부터의 sHASEGP가 그들의 촉매 활성을 위해 당화를 필요로 하는지에 대하여 모순되는 데이터가 존재한다. 예를 들어, 효소적 활성 벌 독소 하이알우로니다제는 이.콜리와 같은 당화 기작이 없는 세포에서 합성될 수 있다. 더욱이, 정제된 소 고환 하이알우로니다제를 PNG아제로 처리하면 효소 활성을 불활성화시키지 않는다(Yamagata et al 1997). 다른 연구는 탈당화 후 활성의 손실을 보고하며 이황화 결합이 추가로 필요함을 보고한다.

[0626] 모든 그러한 이전의 연구는 조악하거나 부분적으로 정제된 제제를 이용하여 이루어졌으므로, 활성의 손실이 탈당화 효소가 미정제 제제중의 오염성 프로테아제에 노출된 결과였는지 또는 당화와 촉매 활성 간의 직접적인 기능적 관계의 결과인지는 명백하지 않았다.

[0627] a. 프로토콜

[0628] 기능적 N-결합된 당화가 무단백질 상태하에서 CHO 계 발현 시스템을 이용하여 사람 sHASEGP내로 도입될 수 있는지를 결정하기 위하여, 사람 sHASEGP-HIS6을 암호하는 cDNA를 화학적으로 정의된 배지에서 IRESpuro 비시스트론 카세트를 이용하여 CHO 세포에서 발현시켰다. 세포를 CHO CDM(인비트로겐/깁코)에서 72시간 동안 성장시키고, 이어서 농축시키고, 30 kDa 컷오프 막을 갖는 펠리콘 TFF 유닛(밀리포어)에서 접선 유동 정용여과시켰다. 농축물을 10 mM Hepes PH 7.4 50mM NaCl과 교환시켰다. 이어서 정용여과물을 DEAE 스트림라인 세파로즈 수지에 부하하고 파마시아 FPLC 수지에서 0-1M NaCl의 NaCl 구배로 용출시켰다. 사람 sHASEGP는 10-30% NaCl 사이에서 용출시켰다. 컬럼 분획에서 sHASEGP의 농도는 효소의 대다수가 10-30% NaCl 구배에서 회수됨을 결정하였다. 10-30% NaCl 구배로부터의 효소를 이어서 Ni로 하전된 IMAC 수지에서의 친화성 크로마토그래피에 의해 추가 정제하였다. 50 mM 아세테이트 pH 5.0을 갖는 10 mM 이미디졸로 세척한 후 IMAC 수지로부터 사람 sHASEGP를 용출시켰다. 단백질을 농축시키고 10 mM Hepes pH 7.4에 대하여 투석시켰다. 매우 정제된 효소는 1 mM 칼슘 및 1 mg/ml HSA의 존재하에서 ELISA-계 비오틴화 기질 미세적정 분석에서 97,000 Units/mg 단백질의 비 활성을 보유하는 것으로 나타났다.

[0629] 분자량과 관련한 단백질의 변화를 검출하기 위하여, 정제된 사람 sHASEGP를 PNG아제 또는 뉴라미니다제로 밤새 처리하고 젤 전기영동하고, 전기이동시키고 HRP 결합된 항 His6 모노클로날 항체(퀴아젠)을 이용한 웨스턴 블롯 분석 및 ECL 검출을 하였다.

[0630] b. 결과

[0631] 웨스턴 블롯 분석 결과는 CHO 세포에서 생산된 사람 sHASEGP가 PNG아제 처리에 민감함을 밝혔다. 사람 sHASEGP의 상대적 분자량은 단백질이 매우 당화되었음을 밝혔다. PNG아제로 밤새 처리한 경우, 사람 sHASEGP는 단일 종류로 감소되어 분해되지 않은 밴드의 온건한 이질성이 N-결합된 당 잔기에 기인할 수 있음을 확인하였다. PNG아제 F 부분 분해는 미처리로부터의 중간 이동 및 더 긴 처리에서 점진적인 이동을 보유주었다. 밴드가 7% 젤에서 다소 확산되었지만, 적어도 6개의 다른 중간체 이소형태가 나타났다.

[0632] 뉴라미니다제로 sHASEGP의 처리 결과 CHO 세포가 사실상 시알화된 사람 sHASEGP를 합성할 수 있었음을 밝혔다. 뉴라미니다제 처리 및 7% 젤에서의 sHASEGP의 웨스턴 블롯 분석시, CHO 유래 사람 재조합 sHASEGP는 미처리 sHASEGP와 비교할 때 이동성에서 약 1-3 kDa 이동을 밝혔다. 따라서 이것은 실질적으로 시알화된 사람 sHASEGP의 생성의 첫번째 보고이다. 이것은, 많은 종으로부터의 천연 정자 sHASEGP가 시알화가 결핍되며 시알산 특이적 렉틴과 반응하지 않으므로, 안정성 및 사람 sHASEGP의 혈청 반감기를 개선하는데 매우 중요하다.

[0633] sHASEGP의 FACE 분석

[0634] FACE 분석에 의한 활성 sHASEGP 올리고당의 분석은 촉매 활성 sHASEGP의 프로파일의 신속한 결정을 가능하게 한다.

[0635] 프로토콜

[0636] 3D3 5M 클론으로부터의 정제된 하이알우로니다제를 FACE®

N-결합된 올리고당 프로파일링(프로자임)을 이용하여 평가하였다. N-글리카나제(a.k.a PNG아제)로 효소 분해시켜 당단백질 128.7㎍로부터 올리고당을 절단하고, 형광단 ANTS를 이용하여 표지하고, 전기영동에 의해 분리하였다. 올리고당 밴드의 상대적 위치는 샘플과 샘플 희석물을, 중합도(DP) 단위로 이동 거리를 표시하는 올리고당 표준 래더를 따라 러닝시켜 결정하였다.

[0637] 결과

[0638] 하이알우로니다제 샘플을 위한 N-프로파일은 10개 밴드로 구성되며, 이중 6개(올리고당 표준 밴드 G5-G12와 동시 러닝)는 9%를 넘는 강도를 가졌다. 더욱이, G9 표준을 따라 러닝하는 밴드가 35%-46%의 강도로 가장 강했다.

[0639] sHASEGP 올리고당 분석

[0640]

| sHASEGP 올리고당 | 중합도 | 전체의 퍼센트 |
|---|---|---|
| 1 | 15.64 | 1.2 |
| 2 | 13.68 | 3.4 |
| 3 | 11.61 | 10.0 |
| 4 | 10.04 | 10.4 |
| 5 | 8.37 | 35.4 |
| 6 | 7.32 | 9.7 |
| 7 | 6.14 | 9.0 |
| 8 | 5.57 | 12.4 |
| 9 | 3.84 | 2.3 |
| 10 | 3.26 | 0.5 |

[0641] 실시예 11

[0642] 효소 활성을 위한 sHASEGP N-결합된 당화의 의존성

[0643] a. 프로토콜

[0644] 정제된 HIS6 sHASEGP의 샘플을 50 mm 옥틸글루코시드와 함께 또는 없이, 뉴라미니다제와 PNG아제를 함유한 완충액과 37℃에서 밤새 혼합하였다. 올리고당은 웨스턴 블롯 분석으로부터 젤 이동에 의해 제거되는 것으로 확인되었다.

[0645] b. 결과

[0646]

| 샘플 | U/ML |
|---|---|
| Rx 없음 | 22.01 |
| 뉴라미니다제 O/N 50mM OG | 23.57 |
| 50mM OG 있는 PNG아제F | 0.0 |
| 50mM OG o/n 없는 PNG아제 F | 10.74 |

[0647] 실시예 12

[0648] 황화된 글리코스아미노글리칸 및 비황화된 글리코스아미노글리칸에 대한 sHASEGP의 활성

[0649] HA를 이용하는 미세적정계 분석에 더하여, 정제된 기질을 이용한 젤 이동 분석을 이용하여, 다른 글리코스아미노글리칸 또는 프로테오글리칸에 대한 sHASEGP의 기질 특이성을 시험하여 다른 글리코스아미노글리칸에 대한 sHASEGP의 활성을 결정할 수 있다. 많은 하이알우로니다제 분석은 새로운 환원성 N-아세틸아미노기의 생성

(Bonner and Cantey, Clin.Chim. Acta 13: 746-752,1966), 또는 점도의 손실(De Salegui et al.,Arch. Biochem. Bioplays. 121: 548-554,1967) 또는 탁도(Dorfman and Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948)의 측정에 기초하였다. 정제된 기질의 경우, 이들 방법 모두 엔도글루코스아미드 활성의 존재 또는 부재의 결정에 충분하다.

[0650] a. 프로토콜

[0651] 젤 이동 분석 - 정제된 기질을 재조합 sHASEGP와 혼합하여 젤내에서 기질의 이동성을 증가시키는 엔도글루코시다제 활성을 시험한다. 콘드로이친 설페이트 A, 아그레칸 및 D는 칼바이오켐에서 구입하였다. 하이알우로난(사람 탯줄) 콘드로이친 설페이트 C, 더마탄 설페이트, 및 헤파란-설페이트는 칼바이오켐에서 구입한다. 사람 탯줄 하이알우로난은 ICN으로부터 구입하였다. 각 시험 기질은 0.1 mg/ml로 희석시킨다. 정제된 sHASEGP 또는 sHASEGP 발현 세포로부터의 조절된 배지 10 ㎕ 샘플을 원하는 완충액에서 시험 기질 90 ㎕와 혼합하고 37℃에서 3시간 동안 항온처리한다. 항온처리 후, 샘플을 샘플 완충액(Tris EDTA PH 8.0, 브로모페놀 블루 및 글리세롤)으로 중화시키고 15% 폴리아크릴아미드 젤에서 전기영동한다. 글리코스아미노글리칸은 젤을 3% 빙초산중의 0.5% 알시안 블루에서 밤새 염색하고 7% 빙초산에서 탈색시켜 검출한다. 효소의 존재 및 부재하에서 기질 이동을 비교함으로써 분해를 결정한다.

[0652] b. 결과

[0653] 10 ㎕중의 100 유닛의 $sHASEGP_{HIS6}$를 다양한 글리코스아미노글리칸과 프로테오글리칸 10㎍을 함유한 50 ㎍/ml 사람 혈청 알부민을 가진 10 mM Hepes 완충액 90㎕와 2시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 전기영동 분석 및 후속되는 알시안 블루 염색 결과 콘드로이친 설페이트 A, C 및 D, 아그레칸 및 하이알우로난에서는 단일 종으로의 이동성 변화 증가가 나타났지만, 헤파란 설페이트 또는 콘드로이친 설페이트 B에서는 그렇지 않았다. 비분해 글리코스아미노글리칸은 젤의 중간에서 번져서 이동하는 반면, 분해된 생성물은 조금씩 증가하는 래더로서 이동하는 소량의 물질및 염료 전면에서 러닝하는 대다수의 알시안 블루 염색을 나타냈다.

[0654] 실시예 13

[0655] sHASEGP 활성화에 대한 금속 이온의 효과

[0656] 적절한 효소 활성을 위한 당화의 필요에 더하여, 사람 sHASEGP는 적절한 효소 활성을 위해 양이온으로 활성화되는 것으로 밝혀졌다. 정제 과정에서, sHASEGP는 연속적인 크로마토그래피 단계 후 낮은 비활성을 갖는 것으로 나타났다. HIS6태그를 갖는 sHASEGP는 DEAE로부터 균질하게 정제되고 이어서 연속적인 Ni-IMAC 정제될 때 매우 낮은 비활성을 갖는 것으로 나타났다. IMAC 수지는 금속 이온을 킬레이트할 수 있으므로, 다양한 금속을 sHASEGP에 첨가하여 상대적인 효소 활성을 결정하였다.

[0657] a. 프로토콜

[0658] 정제된 sHASEGP를 실온에서 2시간 동안 0.1 mM 니켈(Ni), 코발트(Co), 아연(Zn), 칼슘(Ca) 및 마그네슘(Mg)과 항온처리 한 후 미세적정계 분석에서 하이알우로니다제 활성을 결정하여 시험하였다.

[0659] b. 결과

| 금속염 첨가제 | 중성 활성 U/ml |
|---|---|
| 첨가제 없음 | 11.909 |
| 100 uM Ni | 6.0306 |
| 100 uM Co | 8.972 |
| 100 uM Zn | 3.7476 |
| 100 uM Ca | 101.9892 |

[0660]

[0661] 0.1 mM 칼슘 또는 0.1 mM 마그네슘과 sHASEGP를 항온처리 한 후 하이알우로니다제 활성의 상당한 증가가 발견되었다. 다른 금속과의 항온처리 후에는 그러한 활성화가 발견되지 않았다. sHASEGP에의 칼슘의 첨가는 효소의 비활성을 A280 측정에 기초할 때 단백질 mg 당 약 97,000 유닛까지 증가시켰다. 칼슘 및 마그네슘 금속의 투여량 반응 곡선을 이어서 시험하여 효소에 대한 금속 이온의 적정 농도를 결정하였다.

| mM 2가 금속 | [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 |

[0662]

[0663] sHASEGP의 활성화는 마이크로몰 범위에서 발생하는 것으로 밝혀졌다. 10 mM을 넘는 농도는 칼슘 및 마그네슘 둘 다에 대해 억제성이었다. 효소외의 기질의 비특이적인 활성화를 배제하기 위해, 10 mM Hepes 완충액중의 칼슘 클로라이드를 미세적정 플레이트상의 고정된 비오틴화 기질과 항온처리하고 세척하였다. 효소가 세척된 칼슘 예비항온처리된 플레이트에 첨가될 때 활성화는 발견되지 않았다. 활성화를 또한 포스포리파제 C 방출된 천연 sHASEGP에서 시험하였으며, 그 결과 카르복시 말단 HIS6 에피토프 태그의 인위성을 배제하면서, 칼슘에서의 유사한 활성화를 밝혔다.

[0664] 실시예 14

[0665] sHASEGP의 활성에 대한 알부민의 효과

[0666] 재조합 rHUPH20 및 도살장 고환-유래 하이알우로니다제의 다른 제제의 희석액은 적절한 활성을 위해 칼슘에 더하여 알부민을 필요로 함이 밝혀졌다.

[0667] a. 프로토콜

[0668] 사람 혈청 알부민(ICN)을 칼슘을 가진 10 mM Hepes 완충액에서 희석시켜 효소 활성에 대한 알부민 단백질의 효과를 결정하였다. sHASEGP와 시판 제제를 이용한 효소 분석은 1 mM $CaCl_2$ 및 1 mg/ml 사람 혈청 알부민을 이용하여 검사하였다.

[0669] b. 결과

[0670] 하이알우로니다제 활성의 활성화는 알부민의 존재하에서 높은 희석율에서 발견되었다. 이 활성화가 변성 방지의 결과인지 또는 알부민이 기질의 이용가능성에 영향을 주었는지는 명확하지 않았다. 사람 sHASEGP의 바람직한 제제는 따라서 알부민 및 칼슘 또는 마그네슘으로 구성된 금속 염을 포함할 수 있었다.

[0671] 실시예 15

[0672] 정제된 sHASEGP의 생체내 스프레딩 활성

[0673] a. 프로토콜

[0674] 10 mM Hepes PH 7.4, 150 mM NaCl 0.1% 플루로닉중의 정제된 sHASEGP를 0.15M NaCl을 가진 피로젠없는 물에서 0.5U/㎕로 희석시켰다. 최종 20 ㎕ 염수에서의 연속적인 희석에 의해 주사 당 0.01, 0.05, 0.1 유닛을 제공하였다. 20 ㎕의 트리판 블루 용액을 40 ㎕의 최종 부피로 첨가하고, 케타민/자일라진 투여에 의해 복강내로 마취된 $balb^{Nu/Nu}$ 마우스의 각 측상의 외측 피부내로 피하 주사하였다. 염료 영역을 t=0 내지 t=45 분에서 마이크로캘리퍼스로 2차원에서 측정하였다. 면적은 $mm^2$로서 나타냈다. 대조군으로서 중성 활성이 없으나 분비되는 재조합 사람 HYAL1을 포함시켰다.

[0675] b. 결과

| 시험 제품 | 45분에서 염료 면적 |
|---|---|
| A. 염수 대조구 | 51.5mm$^2$ |
| B. sHASEGP 0.01U | 76.8 mm$^2$ |
| C. sHASEGP 0.05U | 98.22mm$^2$ |
| D. sHASEGP 0.10U | 180.4mm$^2$ |
| E. HYAL1 100U | 67.48 mm$^2$ |

[0676]

[0677] 실시예 16

[0678] sHASEGP 확산 활성의 역학

[0679] a. 프로토콜

[0680] 재조합 정제 sHASEGP$_{His6}$을 2 분취액으로 분리하였다. 하나는 가열된 뚜껑을 가진 열사이클러에서 15분동안 95℃로 가열시켰다. 나머지 하나는 실온에서 두었다. 효소 활성의 열적 불활성화는 미세적정계 효소 분석에서 확인되었다. 역학 분석의 경우, 열 불활성화 대 천연 물질을 시험하였다. 정제된 sHASEGP 4 유닛 또는 등가의 열 불활성화 물질을 트리판 블루 염료와 함께 피하 주사하였다. 최대 15분까지 다양한 시점에서 면적을 시험하였다.

[0681] b. 결과

| 4 유닛<br>t 주사 후 분 | 열불활성화된 4 유닛<br>t 주사 후 분 |
|---|---|
| $t_0$ = 52.38 | $t_0$ = 50.58 |
| $t_3$ = 116.51 | $t_3$ =65.48 |
| $t_{6.5}$= 181.93 | $T_{6.5}$ =63.87 |
| $t_{10}$= 216.96 | $T_{10}$ =65.80 |
| $t_{16}$= 279.99 | $T_{16}$ =74.3 |

[0682]

[0683] 실시예 17

[0684] sHASEGP에 의해 분해된 표피 장벽의 회복

[0685] a. 프로토콜

[0686] 피하 투여 후 sHASEGP로 개방된 기공의 재생 시간을 확립하기 위하여, 정제된 sHASEGP 2 유닛 또는 염수 대조군을 t=0에서 동물에서 두 개의 반대 외측 부위내로 피하 주사하고 이어서 30분, 60 분 및 24시간에 동일한 부위에서 트리판 블루를 주사하였다. 주사 후 t=15분에서 염료 확산의 면적을 대조군과 비교하여 각 시점에서 기록하였다.

[0687] b. 결과

| 2 유닛<br>T sHASEGP 주사 후 시간 | 염수 대조구<br>t sHASEGP 주사 후 시간 |
|---|---|
| $t_{0.5hr}$= 183 | $t_{0.5hr}$= 54 |
| $t_{1hr}$= 167 | $t_{1hr}$= 50 |
| $t_{22hr}$= 61 | $t_{22hr}$= 48 |

[0688]

[0689] 상기 결과는 표피 장벽이 효소 2유닛의 투여 후 24시간이내에 재구성됨을 입증한다.

[0690] 실시예 18

[0691] sHASEGP에 의해 개방된 채널의 크기의 결정

[0692] 사이질 공간에서 사람 sHASEGP 개방된 채널이 작은 분자, 즉 트리판 블루 염료의 확산을 허용하기에 충분한 것으로 나타났다. 하지만, sHASEGP의 존재하에서 확산할 수 있는 입자의 크기에 대한 상한선은 알려지지 않았다.

[0693] a. 프로토콜

[0694] 다양한 크기의 형광 분자를 이용하여 사람 sHASEGP에 의해 개방된 채널의 크기를 결정하였다. 4,400 및 2백만 Da 평균 분자량의 형광화된 덱스트란(시그마) 및 20 나노미터 내지 500 나노미터의 한정된 직경의 형광 표지된 비드(분자 프로브)를 40 ㎕ 부피로 피하 투여하고 이어서 sHASEGP 또는 염수 대조군을 동일 부위에서 주사하였다. 이어서 염료 프론트의 면적을 주사 후 15분에 2차원으로 측정하였다.

[0695] b. 결과

| 확산 제제 | 확산시험입자크기 | 15분에서 면적 | 표준 편차 |
|---|---|---|---|
| sHASEGP | 4400 Da | **84.2** | 25.7 |
| 대조구 | 4400 Da | **38.0** | 5.8 |
| sHASEGP | 2x10E6 Da | **141.2** | 4.5 |
| 대조구 | 2x10E6 Da | **51.7** | 8.1 |
| sHASEGP | 20nm 직경 | **92.3** | 20.6 |
| 대조구 | 20nm 직경 | **51.6** | 3.0 |
| sHASEGP | 100nm 직경 | **61.0** | 5.7 |
| 대조구 | 100nm 직경 | **40.0** | 7.0 |
| sHASEGP | 200nm 직경 | **35.5** | 1.6 |
| 대조구 | 200nm 직경 | **27.9** | 8.2 |
| sHASEGP | 500nm 직경 | **44.8** | 13.6 |
| 대조구 | 500nm 직경 | **41.2** | 9.8 |

[0696]

[0697] 상기 결과는 약 1 kDa(트리판 블루) 내지 50 nm 직경(라텍스 비드)의 분자가 sHASEGP의 투여 후 확산 증가를 나타냄을 입증하였다. 소 혈청 알부민(66 kDa)이 트리판 블루와 유사한 확산 역학을 나타낸 한편, 50 nm 라텍스 비드는 확산하는 데 상당히 더 많은 시간을 요했다. 500 nm 비드는 480분까지 확산을 나타내지 않았다.

[0698] 실시예 19

[0699] 사람 sHASEGP의 피하 동시주사 후 비오틴화 항체의 혈청 약동학 프로파일

[0700] a. 프로토콜

[0701] 암컷 Balb/c 마우스를 케타민/자일라진의 혼합물로 마취시켰다. 이어서 마우스를 염수 또는 4 유닛의 활성을 갖는 20 ㎕ sHASEGP와 혼합된 비오틴화 마우스 IgG의 0.5 mg/ml 용액 20 ㎕로 피하 주사하였다.

[0702] b. 결과

| 주사 후 시간 | 대조구 | sHASEGP (4U) |
|---|---|---|
| 혈청 IgG t=0 hrs | 0 ng/ml | 0 ng/ml |
| 혈청 IgG t=2hrs | 0 ng/ml | 360 ng/ml |
| 혈청 IgG t=51hrs | 4152 ng/ml | 4176 ng/ml |

[0703]

[0704] 상기 결과는 sHASEGP가 순환계에서 큰 분자들의 혈청 분배의 역동학을 증가시킴을 입증한다. 비오틴화 Ig가 2시간째에 대조군에서 검출되지 않는 반면, sHASEGP 그룹에서는 2시간째에 360 ng/ml이 나타났다.

[0705] 실시예 20

[0706] 사람 sHASEGP의 정맥내 주사 후 피하 주사된 분자의 스프레딩 활성

[0707] a. 프로토콜

[0708] 염료 주사를 위한 4 부위를 각 시험 물품 및 담체 대조군의 투여마다 이용하였다. 염료 주사는 정맥내 주사 후 45분이었다. 시험 또는 대조군 물품의 각 투여량을 2 동물내로 정맥내 주사하였다. 효소 투여 후 45분에 염료 프런트 면적의 측정은 각 투여량 또는 담체 대조군에 대해 2.5, 5, 10 및 15분에서 계산되었다.

[0709] b. 결과

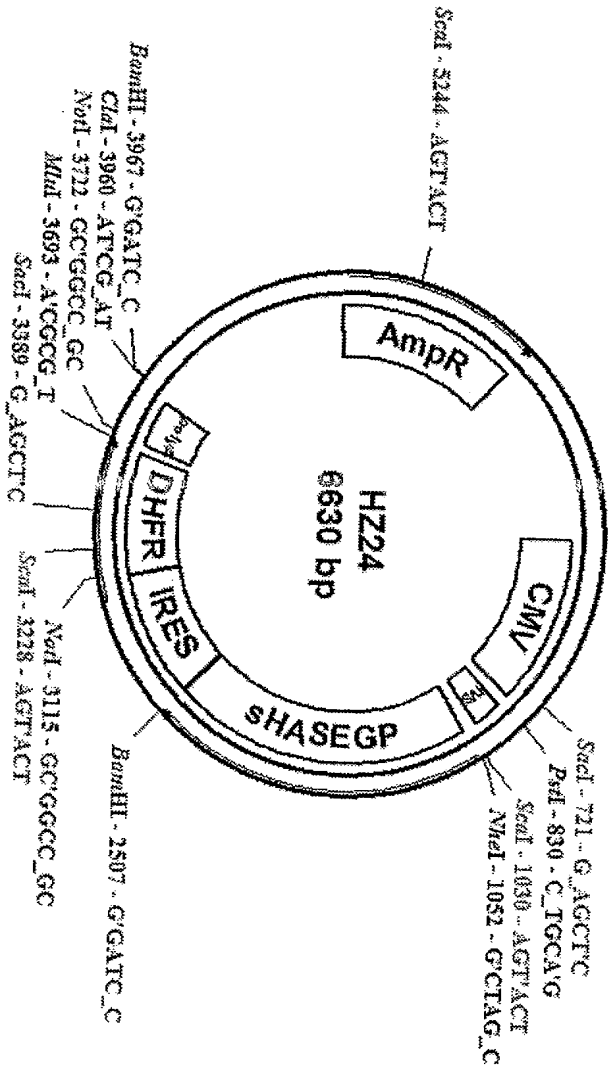
[0710] 결과는 매우 정제된 sHASEGP가 정맥내 투여시 말단 조직까지 전신성으로 이용가능함을 입증하였다. 전신성으로 투여된 sHASEGP의 스프레딩 활성은 투여량 의존성이었으며, 10 유닛 주사는 담체 대조군과 구별되지 않았다.

| 타 입 | 투여량 IV | 시간(분) | 평균 면적 ($mm^2$) | SD |
|---|---|---|---|---|
| PH20 | 1000 | 2.5 | 86.417 | 2.834193 |
| PH20 | 1000 | 5 | 102.17 | 2.221146 |
| PH20 | 1000 | 10 | 124.53 | 6.304944 |
| PH20 | 1000 | 15 | 129.81 | 1.434319 |
| PH20 | 300 | 2.5 | 59.137 | 7.218615 |
| PH20 | 300 | 5 | 73.638 | 7.51197 |
| PH20 | 300 | 10 | 87.092 | 8.686008 |
| PH20 | 300 | 15 | 92.337 | 10.66466 |
| PH20 | 100 | 2.5 | 56.308 | 7.741934 |
| PH20 | 100 | 5 | 63.156 | 11.42052 |
| PH20 | 100 | 10 | 76.519 | 16.18449 |
| PH20 | 100 | 15 | 77.432 | 17.32264 |
| PH20 | 30 | 2.5 | 50.534 | 10.64287 |
| PH20 | 30 | 5 | 59.493 | 5.163971 |
| PH20 | 30 | 10 | 68.102 | 11.00071 |
| PH20 | 30 | 15 | 71.118 | 9.934212 |
| PH20 | 10 | 2.5 | 36.4 | 3.807072 |
| PH20 | 10 | 5 | 39.859 | 6.680932 |
| PH20 | 10 | 10 | 45.649 | 4.44936 |
| PH20 | 10 | 15 | 48.41 | 6.546835 |
| 대조구 | 0 | 2.5 | 34.652 | 5.935037 |
| 대조구 | 0 | 5 | 36.279 | 3.614544 |
| 대조구 | 0 | 10 | 44.687 | 5.821216 |
| 대조구 | 0 | 15 | 53.002 | 2.812439 |

[0711]

## 도면

### 도면1




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DeliaTroph Pharmaceuticals, Inc.

Frost, Gregory

Kundu, Anirban

Bookbinder, Louis

<120> SOLUBLE HYLAURONIDASE GLYCOPROTEIN (SHASEGP), PROCESS FOR PREPARING THE SAME, USES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING THEREOF

<130> DELIA1340WO

<150> US 60/452,360

<151> 2003-03-05

<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 Anchored Hyaluronidase Glycoprotein

<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> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking N483
and terminating at Y482 with BamHI site in the 5'
end

<400> 8

aattggatcc tcagtagaaa atttgaggtt cttc 34

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking Y482
and terminating at F481 with BamHI site in the 5'
end

<400> 9

aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking F481
and terminating at I480 with BamHI site in the 5'
end

<400> 10

aattggatcc tcaaatttga ggttcttctg tctc 34

<210> 11

<

211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking I480
and terminating at Q479 with BamHI site in the 5'
end

<400> 11

aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking Q479
and terminating at P478 with BamHI site in the 5'
end

<400> 12

aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer to generate GPI anchor lacking P478
and terminating at E477 with BamHI site in the 5'
end

<400> 13

aattggatcc tcattcttct gtctccatgg g 31

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward Primer with NheI restriction site at 5'
end

<400> 14

aattgctagc atgggagtgc taaaattcaa gc 32

<210> 15

<211> 1473

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1473)

<223> sHASEGPup to P478 and His Tagged

<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> SpacerHisFor Primer
<400> 17
ataattggat ccggttctgg tgctcaccat caccatcac 39

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SpacerHisRev Primer

<400> 18

tataattgcg gccgcctaat ggtgatggtg atggtgag 38

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at N 483

<400> 19

aatggatcca ttgtagaaaa tttgaggttc 30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at Y 482

<400> 20

aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc 30

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at F 481

<400> 21

aattggatcc gaaaatttga ggttcttctg 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at I 480

<400> 22

attggatcca atttgaggtt cttctgtctc 30

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at Q 479

<400> 23

aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc 29

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at P 478

<400> 24

aattggatcc aggttcttct gtctccatg 29

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' REVERSE PRIMER WITHOUT STOP CODON FOR
GENERATING truncation product HIS-sHASEGP lacking GPI
anchor and ending at E 477

<400> 25

aattggatcc ttcttctgtc tccatggg 28

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at A 467

<400> 26

aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at A 447

<400> 27

aattggatcc ctaagctttc tccttacaac tcaag 35

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at S 430

<400> 28

aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt cttc 34

<210> 29

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at G 413

<400> 29

aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag 36

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at S 394

<400> 30

aattggatcc ctatgaattc cagtttttcc ttatac 36

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant
ending at A 372

<400> 31

aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg 35

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify sHASEGP deletion mutant

ending at S 347

<400> 32

aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg 33

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LN forward primer for site directed mutagenesis to generate sHASEGP fusion with kappa leader with L 36 as the first sHASEGP amino acid after the kappa leader

<400> 33

ctgaatttca gagcacctcc tgttattcc 29

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> FR forward primer for site directed mutagenesis to generate sHASEGP fusion with kappa leader with F 38 as the first sHASEGP amino acid after the kappa leader

<400> 34

ttcagagcac ctcctgttat tccaaatg 28

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Asp reverse primer for site directed mutagenesis
to generate sHASEGP fusion with kappa leader with
Asp as the last Kappa leader amino acid before L

36 or F 38 of PH-20

<400> 35

gtcaccagtg gaacctggaa ccc 23

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gly reverse primer for site directed mutagenesis
to generate sHASEGP fusion with kappa leader with
Gly as the last Kappa leader amino acid before L
36 or F 38 of PH-20

<400> 36

accagtggaa cctggaaccc agag 24

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for first fragment of kappa leader

<400> 37

gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for first fragment of kappa leader

<400> 38

cccagagcag cagtacccat agcaggagtg 30

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for second fragment of kappa leader

<400> 39

ggtactgctg ctctgggttc caggttccac 30

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for second fragment of kappa leader

<400> 40

gcgtcaccag tggaacctgg aacccag 27

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nhe Forward primer for kappa leader

<400> 41

attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EcoR1 reverse  primer for kappa leader

<400> 42

aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse IgK-chain leader sequence

<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> K-leader SPE 1 FORWARD Primer

<400> 44

actcactagt gctagcatgg agacagacac 30

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K-leader MLU1 REV primer

<400> 45

aattacgcgt gaattcgtca ccagtggaac 30

<210> 46

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kappa leader fusion protein with sHASEGP with F 38

as the first amino acid of the putative mature secreted sHASEGP (up to 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' Primer BAM REV sHASEGP with GPI anchor up to L
509 including STOP

<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 gcaattttct 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 gcaattttct 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 plasmid vector

<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 cctccccccc 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 gtattttctc 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 cccttttttg 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 caaattttct 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