(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1942588 B
(45)授权公告日 2013.06.12

(21)申请号 200480011489.7
(22)申请日 2004.03.05
(30)优先权数据
60/452,360 2003.03.05 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.10.28
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2004/006656 2004.03.05
(87)PCT申请的公布数据
WO2004/078140 EN 2004.09.16
(73)专利权人 海洋酶公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 L·H·布宾枫 A·昆度
G·I·弗罗斯特
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 路小龙
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C12N 5/16(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
C12N 9/00(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
C12N 1/20(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)
C12P 21/06(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
US 5721348 A,1998.02.24, 权利要求 1-6.
Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team.Generation and initial analysis of more than 15,000 full-lengthhuman and mouse cDNA sequences.Proc.Natl.Acad.Sci.Usa99 26.2002,99(26),16899-16903.
Ying Lin.Molecular cloning of the human and monkey spermsurfaceprotein PH-20.Proc.Natl.Acad.Sci.Usa90.1993,9010071-10075.
审查员 肖晶

权利要求书4页 说明书88页
序列表39页 附图1页

(54)发明名称

可溶性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)、制备它们的方法、它们的用途和包含它们的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及发现新的可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP′ s)、制备方法,和它们帮助其他分子的给药或者缓解糖胺聚糖相关的病理的用途。描述了可溶性中性活性 sHASEGP 结构域的最小化的活性多肽结构域,其包括对于功能性的中性活性透明质酸结构域而言所必需的天冬酰胺-连接的糖部分。本发明包括了经修饰的可增强 sHASEGP 的分泌的氨基末端前导肽。本发明进一步包括重组 sHASEGP 的唾液酸化和聚乙二醇化形式,以增强其稳定性和血清药物动力学,使其优于天然发生的来自屠宰场的酶。进一步描述了基本上纯的重组 sHASEGP 糖蛋白的合适制剂,所述的重组 sHASEGP 糖蛋白来自于可产生适当的糖基化的真核细胞,而该糖基化对于该蛋白的最佳活性是必需的。

CN 1942588 B

1. 纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中：

所述糖蛋白包含至少一个糖部分，所述糖部分共价连接于所述透明质酸酶多肽的天冬酰胺 (N) 残基上；

所述糖蛋白由显示为 SEQ ID NO.1 的氨基酸 36-477、36-478、36-479、36-480、36-481、36-482 或 36-483 的氨基酸序列组成；

所述糖蛋白是可溶性的；以及

所述糖蛋白是中性活性的。

2. 如权利要求 1 所述的纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中所述多肽由编码 SEQ ID NO.1 的氨基酸 36-482 或 SEQ ID NO.1 的氨基酸 1-482 的核酸分子编码。

3. 如权利要求 2 所述的纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中所述核酸分子具有 SEQ ID NO.48 中所示的核苷酸序列。

4. 如权利要求 1 所述的纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中所述多肽在 CHO 细胞中被分泌。

5. 如权利要求 1 所述的纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中所述多肽由显示为 SEQ ID NO.1 的氨基酸 36-482 的氨基酸序列组成。

6. 如权利要求 1 所述的纯化的透明质酸酶糖蛋白，其中，所述的糖部分被共价连接到天冬酰胺残基上，所述天冬酰胺残基选自 SEQ ID NO.1 中所示的氨基酸 82、166、235、254、368 或 393。

7. 如权利要求 1-6 的任一项所述的透明质酸酶糖蛋白多肽，其中，所述多肽用聚合物修饰。

8. 如权利要求 7 所述的透明质酸酶糖蛋白多肽，其中，所述聚合物是 PEG 或葡聚糖。

9. 组合物，其包括权利要求 1-6 的任一项所述的透明质酸酶糖蛋白。

10. 组合物，其包括权利要求 6 所述的透明质酸酶糖蛋白多肽。

11. 核酸分子，其包括编码权利要求 1 所述的透明质酸酶糖蛋白多肽的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列包括终止密码子，由此，在细胞中表达和分泌后，权利要求 1 所述的多肽被产生。

12. 核酸分子，其编码截短的透明质酸酶多肽，并且包括选自下列的序列：

(a) SEQ ID NO.48 中所示的核苷酸序列；和

(b) 显示为 SEQ ID NO.6 的核苷酸 106-1446 的核苷酸序列。

13. 如权利要求 12 所述的核酸分子，其中所述核苷酸序列编码用于分泌所述被编码多肽的信号序列。

14. 如权利要求 13 所述的核酸分子，其中所述信号序列是 IgGκ 链前导肽。

15. 如权利要求 14 所述的核酸分子，其中所述 IgGκ 链前导肽具有 SEQ ID NO：43 所示的核苷酸序列。

16. 载体，其包含权利要求 11-15 的任一项所述的核酸分子。

17. 如权利要求 16 所述的载体，其包含 SEQ ID NO：51 中所示的核苷酸序列。

18. 如权利要求 16 所述的载体，其为表达载体。

19. 如权利要求 16 所述的载体，其为真核生物载体。

20. 如权利要求 16 所述的载体，其包括核苷酸序列，该核苷酸序列指导由有效连接到其上的核苷酸序列编码的任何多肽的分泌。

21. 如权利要求 16 所述的载体，其为毕赤酵母 (Pichia) 载体、大肠杆菌 (E. coli) 载体或病毒载体。

22. 分离的细胞，其包含权利要求 16-21 的任一项所述的载体。

23. 如权利要求 22 所述的细胞，其为原核细胞或真核细胞。

24. 如权利要求 22 所述的细胞，其选自细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或动物细胞。

25. 如权利要求 22 所述的细胞，其为哺乳动物细胞。

26. 如权利要求 25 所述的细胞，其为中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

27. 用于产生权利要求 1-7 的任一项所述的可溶性透明质酸酶糖蛋白多肽的方法，包括：

将被有效地连接于启动子的、编码权利要求 1-7 的任一项所述的多肽的核酸导入细胞中，所述细胞将 N- 连接的糖部分整合到所述多肽中；

在被编码的多肽被所述细胞表达和分泌的条件下培养所述细胞；和

回收所述的被表达的多肽。

28. 用于产生可溶性透明质酸酶多肽的方法，包括：

将被有效地连接于启动子的、权利要求 11-15 的任一项所述的核酸分子或将权利要求 16 所述的载体导入细胞中，所述细胞能够将 N- 连接的糖部分整合到所述多肽中；

在被编码的多肽被所述细胞表达和分泌的条件下培养所述细胞；和

回收所述的被表达的多肽。

29. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述细胞是真核细胞。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中，真核细胞选自哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或植物细胞。

31. 如权利要求 29 所述的方法，其中，所述细胞是 CHO 细胞。

32. 用于产生可溶性透明质酸酶多肽的方法，包括：

在被编码的多肽被细胞表达和分泌的条件下培养权利要求 22 所述的细胞；和

回收所述的被表达的多肽。

33. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述细胞在适合于产生所述多肽的条件下、在 0.1-1mM 丁酸钠存在下被培养。

34. 如权利要求 27 所述的方法，其中回收所述的被表达多肽的方法包括：

在低离子强度下将含有所述被表达多肽的培养基与中性 pH 下的阴离子交换树脂相接触；

用约 400mM 的盐洗脱所述多肽；

将所述多肽在约 0.5M 硫酸铵存在下与疏水相互作用层析树脂接触；

将硫酸铵中的所述多肽与苯基硼酸树脂接触；

在低盐和中性 pH 下洗脱所述多肽；

将所述多肽与羟磷灰石树脂接触；和

用约 100mM 磷酸钠洗脱所述多肽，从而产生基本上被纯化的多肽。

35. 药物组合物，其包含权利要求 1-7 的任一项所述的透明质酸酶多肽糖蛋白。

36. 权利要求 35 所述的药物组合物，其包含药物载体。

37. 如权利要求 35 所述的药物组合物，进一步包含药物活性试剂。

38. 如权利要求 37 所述的药物组合物，其中，所述药物活性试剂选自：化疗剂、止痛剂、抗炎剂、抗微生物剂、抗阿米巴虫剂、杀毛滴虫剂、抗帕金森剂、抗痢疾剂、抗痉挛剂、抗抑郁剂、抗风湿剂、抗真菌剂、抗高血压剂、退热剂、抗寄生虫剂、抗组胺剂、α－肾上腺素激动剂、α 封阻剂、麻醉剂、支气管扩张剂、杀生物剂、杀菌剂、抑菌剂、β 肾上腺素封阻剂、钙通道封阻剂、心血管药剂、避孕药剂、解充血药剂、利尿剂、镇静剂、诊断试剂、电解质试剂、催眠药剂、激素、促血糖增高药剂、肌松弛剂、肌收缩剂、眼用药剂、拟副交感神经药、心理兴奋剂、镇定剂、拟交感神经药、安定剂、泌尿剂、阴道用药剂、杀病毒剂、维生素药剂、非类固醇类抗炎药剂、血管紧张素转化酶抑制剂、多肽、蛋白质、核酸、药物、有机分子和促睡眠剂。

39. 如权利要求 37 所述的药物组合物，其中，所述药物活性试剂选自：胰岛素、细胞因子、抗体和单克隆抗体。

40. 如权利要求 38 所述的药物组合物，其中，所述试剂是化疗剂，所述化疗剂是毒素或肿瘤坏死因子。

41. 如权利要求 38 所述的药物组合物，其中，所述试剂是麻醉剂，所述麻醉剂是利多卡因或布比卡因。

42. 如权利要求 38 所述的药物组合物，进一步包括激素试剂。

43. 如权利要求 42 所述的药物组合物，其中，所述激素试剂是肾上腺素。

44. 如权利要求 35 所述的药物组合物，其为冻干粉末或为液体。

45. 药物组合物，其包含权利要求 8 所述的透明质酸酶糖蛋白多肽。

46. 权利要求 45 所述的药物组合物，其包含药物载体。

47. 权利要求 45 所述的药物组合物，其进一步包含药物活性试剂。

48. 权利要求 47 所述的药物组合物，其中所述药物活性试剂选自：化疗剂、止痛剂、抗炎剂、抗微生物剂、抗阿米巴虫剂、杀毛滴虫剂、抗帕金森剂、抗痢疾剂、抗痉挛剂、抗抑郁剂、抗风湿剂、抗真菌剂、抗高血压剂、退热剂、抗寄生虫剂、抗组胺剂、α－肾上腺素激动剂、α 封阻剂、麻醉剂、支气管扩张剂、杀生物剂、杀菌剂、抑菌剂、β 肾上腺素封阻剂、钙通道封阻剂、心血管药剂、避孕药剂、解充血药剂、利尿剂、镇静剂、诊断试剂、电解质试剂、催眠药剂、激素、促血糖增高药剂、肌松弛剂、肌收缩剂、眼用药剂、拟副交感神经药、心理兴奋剂、镇定剂、拟交感神经药、安定剂、泌尿剂、阴道用药剂、杀病毒剂、维生素药剂、非类固醇类抗炎药剂、血管紧张素转化酶抑制剂、多肽、蛋白质、核酸、药物、有机分子和促睡眠剂。

49. 权利要求 47 所述的药物组合物，其中所述药物活性剂选自胰岛素、细胞因子、抗体和单克隆抗体。

50. 权利要求 47 所述的药物组合物，其为冻干粉末或为液体。

51. 共轭物，其包括如权利要求 1-7 的任一项所述的可溶性多肽或包括如权利要求 1-7 的任一项所述的可溶性多肽的结构域。

52. 如权利要求 35-50 的任一项所述的药物组合物，用于治疗糖胺聚糖过量、用于治疗肿瘤、用于治疗心血管紊乱、用于增加化疗剂向实体瘤中的渗透、用于诱导玻璃体液液化、用于促进坏死组织的血管再造、或用于将尺寸小于 500nm 的分子传送给含有过量糖胺聚糖的组织。

53. 权利要求 52 所述的药物组合物，其中所述的过量的糖胺聚糖底物由瘢痕组织产

生。

54. 权利要求 53 所述的药物组合物，其中所述瘢痕组织是由脊髓损伤引起的神经胶质瘢痕，是手术的结果，或是瘢痕瘤瘢痕。

55. 权利要求 53 所述的药物组合物，其中所述底物与椎间盘突出有关。

56. 如权利要求 35-50 的任一项所述的药物组合物在制备药物中的应用，所述药物用于治疗糖胺聚糖过量、用于治疗肿瘤、用于治疗心血管紊乱、用于增加化疗剂向实体瘤中的渗透、用于诱导玻璃体液液化、用于促进坏死组织的血管再造、或用于将尺寸小于 500nm 的分子传送给含有过量糖胺聚糖的组织。

57. 如权利要求 56 所述的应用，用于治疗糖胺聚糖过量，其中，所述的过量的糖胺聚糖底物由瘢痕组织产生。

58. 如权利要求 57 所述的应用，其中，所述的瘢痕组织是由脊髓损伤引起的神经胶质瘢痕，是手术的结果，或是瘢痕瘤瘢痕。

59. 如权利要求 57 所述的应用，其中，所述底物与椎间盘突出有关。

可溶性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP)、制备它们的方法、它们的用途和包含它们的药物组合物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求在 35U.S.C. §119(e) 下，于 2003 年 3 月 5 日提交的美国申请序列号 60/452,360 的优先权，其内容整体地引入本文以作参考。

技术领域

[0002] 本发明一般性地涉及在中性条件下具有活性的 (neutral-active) 可溶的透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP)、其中的部分，特别是透明质酸酶结构域。更特别地，本发明涉及化学修饰、药物组合物、表达质粒、制造方法和治疗方法，其中将透明质酸酶糖蛋白和其结构域以及编码核酸分子应用于在疾病治疗中糖胺聚糖的治疗性的修饰以及增加直径小于 200 纳米的其它注射分子在动物中的扩散。

背景技术

[0003] 糖胺聚糖 (GAGs) 是胞外基质 (ECM) 中复杂的线性多糖。GAG 的特征为重复的二糖结构，二糖结构由 N- 取代的氨基己糖和糖醛酸组成 [透明质酸 (HA)、硫酸软骨素 (CS)、软骨素 (C)、硫酸皮肤素 (DS)、硫酸乙酰肝素 (HS)、肝素 (H)] 或由 N- 取代的氨基己糖和半乳糖组成 [硫酸角质素 (KS)]。除了 HA 之外，所有均共价结合于核心蛋白 (core proteins)。GAG 连同它们的核心蛋白在结构上被称为蛋白多糖 (PGs)。

[0004] 透明质酸 (HA) 主要发现于哺乳动物的结缔组织、皮肤、软骨中以及滑液中。透明质酸也是眼睛玻璃体的主要组成成分。在结缔组织中，与透明质酸相关的水合作用的水产生了组织之间的空间，从而为细胞运动和增殖创造了有利的环境。透明质酸在与细胞运动有关的生物学现象中发挥关键作用，这些细胞运动包括快速发育 (rapid development)、再生、修复、胚胎发生、胚胎发育、伤口愈合、血管生成和肿瘤发生 (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,1993FASEB J.7 :1233-1241)。此外，透明质酸水平与肿瘤入侵 (tumor aggressiveness) 有关 (Ozello et al.1960 Cancer Res.20 :600-604 ; Takeuchi et al.1976, Cancer Res.36 :2133-2139 ;Kimata et al.1983Cancer Res.43 : 1347-1354)。

[0005] HA 发现于许多细胞的胞外基质中，尤其是软结缔组织中。已发现 HA 具有多种生理学功能，诸如在水和血浆蛋白质的动态平衡方面 (Laurent TC et al(1992)FASEB J 6 :2397-2404)。HA 的产生增加了细胞繁殖，并可能在有丝分裂中发挥作用。这已在运动 (locomotion) 和细胞迁移中得到启示。HA 似乎在细胞调控、发育和分化中发挥作用 (Laurent et al, supra)。

[0006] HA 已经被用于临床医学中。它的组织保护特性和流变特性已经证明可用于眼科手术中，以在白内障手术中保护角膜内皮。血清 HA 在肝病和各种炎症病症如类风湿性关节炎中具有诊断作用。由 HA 的积聚引起的间质水肿可引起各种器官的功能紊乱 (Laurent et

al，supra)。

[0007] 透明质酸蛋白质相互作用也参与胞外基质或“基质(ground substance)”的结构。

[0008] 透明质酸酶是一组中性和酸性活性酶，在整个动物界都能被发现。透明质酸酶在底物特异性和作用机制方面有所变化。

[0009] 有3大类透明质酸酶：

[0010] 1.哺乳动物类型透明质酸酶(EC 3.2.1.35)，其是内-β-N-乙酰氨基己糖苷酶，以四糖和己糖作为主要的终产物。它们具有水解和转糖苷酶活性，能够降解透明质酸和硫酸软骨素(CS)，尤其是C4-S和C6-S。

[0011] 2.细菌透明质酸酶(EC 4.2.99.1)降解透明质酸，并不同程度地降解CS和DS。它们是内-β-N-乙酰氨基己糖苷酶，它们通过β消去反应发挥作用，主要产生二糖终产物。

[0012] 3.来自水蛭、其它寄生虫和甲壳类动物的透明质酸酶(EC 3.2.1.36)，其是内-β-葡糖醛酸酶，通过水解β1-3键产生四糖和己糖终产物。

[0013] 哺乳动物透明质酸酶可以进一步分为两组：中性活性(neutral active)和酸性活性(acidactive)酶。在人基因组中有六种透明质酸酶样基因：HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、HYALP1和PH20/SPAM1。HYALP1是假基因，HYAL3对任何已知的底物都没有显示出具有酶活性。HYAL4是软骨素酶(chondroitinase)，对透明质酸缺少活性。HYAL1是原型酸性活性酶，PH20是原型中性活性酶。酸性活性透明质酸酶，诸如HYAL1和HYAL2在中性pH中缺少催化活性。例如，HYAL1在体外pH4.5以上无催化活性(Frost et al Anal Biochemistry，1997)。HYAL2是酸性活性酶，在体外具有非常低的比活性。

[0014] 透明质酸酶样(hyaluronidase-like)酶也可以表征为那些通过糖基磷脂酰肌醇锚锁定到质膜上的酶，诸如人HYAL2和人PH20(Danilkovitch-Miagkova，et al.Proc Natl Acad Sci USA.2003 Apr 15；100(8)：4580-5，Phelps et al.，Science 1988)，和那些为可溶性的酶，诸如人HYAL1(Frost et al，Biochem Biophys Res Commun.1997Jul 9；236(1)：10-5)。然而，种与种之间是有变化的：例如牛PH20非常松散地附着到质膜，而不通过磷脂酶敏感性的锚(phospholipase sensitive anchor)被锚定(Lalancette et al，Biol Reprod.2001 Aug；65(2)：628-36)。牛透明质酸酶的这一独特特征使得可以使用可溶性牛睾丸透明质酸酶作为提取物用于临床应用(Wydase®Hyalase®)。其它种的PH20是脂锚定的酶，其在不应用去污剂或脂肪酶的情况下是不具可溶性的。例如，人PH20通过GPI锚被锚定到质膜。已经尝试制备不会引入脂类锚的人PH20DNA构建物，但得到的是无催化活性的酶，或者不可溶的酶(Arming et al Eur JBiochem.1997 Aug 1；247(3)：810-4)。发现天然存在的猕猴精子透明质酸酶既可以是可溶性的，又可以是膜结合形式的。64kDa膜结合形式在pH7.0时具有酶活性，而54kDa形式仅在pH 4.0时具有活性(Cherr et al，Dev Biol.1996 Apr 10；175(1)：142-53)。因此，可溶性形式的PH20在中性条件下缺乏酶活性。

[0015] 软骨素酶是在整个动物界都能发现的酶。这些酶通过内切糖苷酶反应降解糖胺聚糖。已知的软骨素酶的具体例子包括软骨素酶ABC(来自普通变形杆菌(Proteus vulgaris)；日本专利特开号6-153947，T.Yamagata，H.Saito，O.Habuchi，andS.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))；软骨素酶AC(来自肝素黄杆菌(Flavobacterium heparinum)；T.Yamagata，H.Saito，O.Habuchi，andS.Suzuki，J.Biol.

Chem.,243,1523(1968));软骨素酶 AC II(来自 Arthrobacteraurescens;K.Hiyama,and S.Okada,J.Biol.Chem.,250,1824(1975),K.Hiyama andS.Okada,J.Biochem.(Tokyo),80,1201(1976));透明质酸酶 AC III(来自黄杆菌某种 Hp 102;Hirofumi Miyazono,Hiroshi Kikuchi,Keiichi Yoshida,Kiyoshi Morikawa,andKiyochika Tokuyasu,Seikagaku,61,1023(1989));软骨素酶 B(来自肝素黄杆菌;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,AkiraTawada,Akiko Ueno,and Keiichi Yoshida,Seikagaku,57,1189(1985));软骨素酶 C(来自黄杆菌某种 Hp102;Hirofumi Miyazono,Hiroshi Kikuchi,Kelichi Yoshida,Kiyoshi Morikawa,and Kiyochika Tokuyasu,Seikagaku,61,1023(1939))和类似物。

[0016] 糖蛋白由共价结合到一个或多个碳水化合物部分的多肽链组成。有两大类糖蛋白,其具有通过 N-糖苷键或 O-糖苷键偶联到它们的组成蛋白质上的碳水化合物。N-连接和 O-连接的聚糖分别通过天冬酰胺 -N-乙酰 -D-葡萄糖胺和丝氨酸(苏氨酸)-N-乙酰 -D-半乳糖胺连接附着到多肽上。复合的 N-连接寡糖不含有末端甘露糖残基。它们只含有末端 N-乙酰葡糖胺、半乳糖和/或唾液酸残基。杂合寡糖含有末端甘露糖残基以及末端 N-乙酰葡糖胺、半乳糖和/或唾液酸残基。

[0017] 对于 N 连接的糖蛋白,在内质网中的肽合成期间,寡糖前体被附着到天冬酰胺的氨基基团上。寡糖部分继而由一系列特异性酶进行加工,剔除和增加糖组成部分。该加工在内质网中进行,并在通过顺面、中间和反面高尔基体的过程中继续被加工。

发明概述

[0018] 本文提供了可溶性的、中性活性的透明质酸酶糖蛋白家族的成员,特别地,提供了人可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白(本文中也称为 sHASEGPs)。本文中提供的 sHASEGP 是 sHASEGP 家族成员,本文中命名为 sHASEGP。本文也提供了可溶性的透明质酸酶结构域及其应用。

[0019] 本发明基于这样的发现,即,通过导入人 PH20cDNA 的缺少一个狭窄区域(narrowregion)的核酸,可以在哺乳动物表达系统中高产量地产生中性活性的透明质酸酶活性,所述狭窄区域编码羧基末端的氨基酸。也提供了对 sHASEGP 的额外的修饰,以利用非天然的前导肽增加分泌。本发明还提供了方法,其通过用聚乙二醇掩蔽蛋白质和对天然的糖基化进行翻译后修饰来修饰 sHASEGP,以延长它的半衰期。先前已经尝试过生产分泌的中性活性的人 sHASEGP,但都是失败的。其结果表明,将人 sHASEGP 多肽截短不但导致中性酶活性丧失,还导致在哺乳动物表达系统中细胞不能分泌重组蛋白质(Arming,et al Eur J Biochem 1997 Aug 1;247(3):810-4)。产生中性活性的分泌型 sHASEGP 对于透明质酸酶的商业生产和治疗应用是至关重要的,本文中公开的发明了克服这些挑战。

[0020] 本发明还包括具有催化活性的人 sHASEGP 糖蛋白,其中,该 sHASEGP 具有至少一个 N-连接糖部分。本文中描述的研究证明,人 PH20 需要 N-连接的聚糖以获得催化活性,而牛和蜂毒透明质酸酶在没有这样的 N-连接聚糖的情况下仍具有活性。无 N-连接部分的人透明质酸酶结构域是不具有催化活性的。因此,不像蜂毒 HASEGP,其可以在大肠杆菌中产生,经典的重组 DNA 技术不能产生具有催化活性的人 sHASEGP。

[0021] 本发明包括用于产生N-连接的sHASEGP糖蛋白多肽的方法和细胞，其通过使用能够引入所述N-连接糖部分的细胞来进行，或通过在sHASEGP多肽上引入所述N-连接部分来进行。还公开了鉴定适当地糖基化的sHASEGP的方法。

[0022] 本发明也提供了具有催化活性的超-唾液酸化的sHASEGP(Super-SialatedsHASEGP)糖蛋白。相比起天然发生的非唾液酸化的牛和羊睾丸sHASEGPs、超-唾液酸化sHASEGPs具有更大的血清半衰期，因此对于酶稳定性和用作静脉内药物是优选的。本发明提供了用于制备超-唾液酸化sHASEGPs、组合物的方法及其应用方法。

[0023] 本发明也提供了由天然GPI锚定缺陷型sHASEGP的拼接变体(splicevariants)编码的蛋白质。

[0024] 本发明还提供了sHASEGP的组合物，其包括携带有金属离子的可溶性sHASEGP糖蛋白，其中，该金属离子是钙、镁或钠。sHASEGPs在所述离子存在的条件下具有最佳活性。也提供了含有所述的金属离子和sHASEGP的制剂。

[0025] 本发明也提供对sHASEGP所作的修饰，以进一步延长半衰期。提供了利用聚合物诸如聚乙二醇和葡聚糖对sHASEGP的化学修饰。这样的修饰使得sHASEGP不会从循环和免疫系统中清除出去，作为甘露糖的糖基化受体和脱唾液酸糖蛋白。本发明还提供了方法，用来连接到特定的功能基团诸如糖基化位点、带正电荷的氨基酸和半胱氨酸。

[0026] 本文也提供了用于鉴定可调节sHASEGP的活化、表达或活性的效应子(effectors)例如包括小分子在内的化合物和诸如pH、温度和离子强度的条件的分析方法。在示范性的分析方法中，评价了受测化合物对sHASEGP透明质酸酶结构域切割已知底物的能力的影响，所述的已知底物通常是糖胺聚糖或蛋白聚糖。调节透明质酸酶结构域的活性的试剂，一般是化合物，特别是小分子，是调节sHASEGP的活性的候选化合物。透明质酸酶结构域也可以被用于产生具有活性扰乱功能的透明质酸酶特异抗体。本文中提供的透明质酸酶结构域包括但不限于，具有被截短的C-末端部分的N-末端糖基水解酶结构域，其在体外显示出催化活性。

[0027] 也提供了编码蛋白质和透明质酸酶结构域的核酸分子。提供了编码可溶性透明质酸酶结构域或其催化活性部分的核酸分子和那些编码全长sHASEGP的核酸分子。编码透明质酸酶结构域的核酸和下游核酸如SEQ ID No.6所描述；sHASEGP的透明质酸酶结构域如SEQ ID No.1(氨基酸35-464)所描述。全长sHASEGP的蛋白质序列和编码核酸序列如SEQ ID No.1和6所描述。

[0028] 本发明也提供了这样的核酸分子，其沿着sHASEGP的编码核酸的全长或沿着全长的至少70％、80％或90％与此sHASEGP编码核酸杂交，提供了编码透明质酸酶结构域或其中的部分的核酸分子。杂交通常是在至少低、通常至少中等、常常是高的严紧(stringency)条件下完成。

[0029] 分离的核酸片段是DNA，包括基因组DNA或cDNA，或是RNA，或可以包括其他组分，诸如蛋白质核酸(protein nucleic acid)或其他核苷酸类似物。分离的核酸可以包括额外的组分，诸如异源或天然的启动子，以及其它的转录和翻译调控序列，这些基因可以被连接至其他基因，诸如报告基因或其他指示基因(indicator genes)或编码指示物的基因。

[0030] 本发明也提供了分离的核酸分子，其包括与编码sHASEGP或其部分的核苷酸序列

互补的分子的序列。

[0031] 本发明也提供了其片段或寡核苷酸，其可以被用作探针或引物，包含至少约 10、14、16 个核苷酸，一般少于 1000 个核苷酸或少于或等于 100 个核苷酸，如 SEQ ID NO.6（或其互补物）所述；或包含至少大约 30 个核苷酸（或其互补物）；或包含沿着它们的全长（或其至少约 70、80 或 90％）与任意此种片段或寡核苷酸杂交的寡核苷酸。片段的长度与使用它们的目的和 / 或感兴趣的基因组的复杂程度有关。通常，探针和引物包含少于约 50、150 或 500 个核苷酸。

[0032] 本发明也提供了包含本文中提供的任何核酸分子的质粒。也提供了含有所述质粒的细胞。这样的细胞包括但不限于，细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞和动物细胞。

[0033] 本发明也提供了增强的哺乳动物表达系统，其应用了能够有效分泌 sHASEGP 的信号前导肽 (signal leaders)。这样的有效促分泌的前导肽氨基酸序列以及与 sHASEGP 形成的融合蛋白的例子参见 SEQ ID Nos.43 和 46。

[0034] 本发明也提供了用于产生 sHASEGP 的方法，其通过将上述细胞在 sHASEGP 可被细胞表达的条件下培养，并回收表达的 sHASEGP 多肽或糖蛋白而进行。用于分离编码其它 sHASEGPs 的核酸的方法也被提供。

[0035] 本发明也提供了 sHASEGP 多肽表达于其表面的细胞，通常是真核细胞，诸如哺乳动物细胞和酵母细胞。这样的细胞被用于药物筛选分析，以鉴定可调节 sHASEGP 多肽的活性的化合物。这些分析方法包括体外结合分析、基于转录的分析，在其中，由 sHASEGP 直接或间接——例如通过活化原生长因子 (pro-growthfactors)——介导的信号转导得到评测。

[0036] 本发明也提供了由这样的核酸分子编码的肽。包括在那些多肽中的是 sHASEGP 透明质酸酶结构域，或具有氨基酸变化的多肽，而特异性和 / 或透明质酸酶活性基本上未变化。特别地，提供了基本上纯的哺乳动物 sHASEGP 糖蛋白，其包括分泌型中性催化活性。

[0037] 本发明也包括透明质酸酶催化结构域，并且还可以包括其他结构域。sHASEGP 可以形成同型二聚体，也可以与一些其他蛋白诸如膜结合蛋白形成异型二聚体。本发明也提供了基本上纯化的糖蛋白，包括与 sHASEGP 具有至少 60％、70％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％同一性的氨基酸序列，其中，百分同一性应用标准算法和缺口罚值 (gap penalties) 来确定，缺口罚值使百分同一性最大化。

[0038] sHASEGP 的拼接变体，特别是那些具有催化活性透明质酸酶结构域的变体在本文中被考虑到。

[0039] 在其他实施方案中，提供了基本上纯化的多肽，其包括 sHASEGP 多肽的透明质酸酶结构域或其催化活性部分，但不包含 SEQ ID No.1 中描述的整个氨基酸序列。属于此列的多肽，包括与 SEQ ID No.1 或 3 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％或 100％序列同一性的氨基酸序列。

[0040] 在特定的实施方案中，提供了编码真核生物透明质酸酶糖蛋白的核酸，命名为 sHASEGP。特别地，所述核酸包括在 SEQ ID No.6 中描述的核苷酸序列，特别地，SEQ ID NO.6 的核苷酸 106-1446 所描述的核苷酸序列，或其中编码具有催化活性的多肽的部分核苷酸

序列。

[0041] 本发明也提供了这样的核酸分子，其在至少低严紧性、通常中等严紧性、更经常地为高严紧性的条件下与 SEQ ID NO.6 或其简并型 (degenerates) 杂交。

[0042] 在一种实施方案中，分离的核酸片段在高严紧性的条件下，与包含 SEQ IDNo：6（或其简并型）所述的核苷酸序列的核酸分子杂交。全长 sHASEGP 描述于 SEQID No.1 中，并由 SEQ ID NO.6 或其简并型编码。

[0043] 本发明也提供了 sHASEGP 的透明质酸酶结构域的突变蛋白，特别是这样的突变蛋白，其中，透明质酸酶结构域的游离 Cys 残基（即，不与透明质酸酶结构域中的任何其它 Cys 残基形成二硫键）被另一氨基酸取代基所取代，通常，尽管不是必须的，是被保守的氨基酸取代基或不会消除活性的取代基所取代，还提供了这样的突变蛋白，其中，特定的糖基化位点被去除。

[0044] sHASEGP 多肽，包括但不限于其拼接变体，以及编码 sHASEGPs 及其结构域、衍生物和类似物的核酸在本文中被提供。也提供了单链分泌型的透明质酸酶糖蛋白，其具有在功能上与通过激活信号肽形成 sHASEGP 而产生的 N- 末端相等价的 N- 末端。在 sHASEGP 的 N82、N166、N235、N254、N368、N393、N490 处具有 7 个潜在的 N- 连接糖基化位点，如 SEQ ID NO :1 中所例示。在半胱氨酸残基 C60-C351 和半胱氨酸残基 C224 至 C238 之间形成二硫键，从而形成核心的透明质酸酶结构域。然而，在羧基末端，额外的半胱氨酸对于中性酶催化活性是被要求的，这样，在 SEQ ID No.1 中，从氨基酸 36 到 Cys 464 的 sHASEGP 构成了最小化的活性人 sHASEGP 透明质酸酶结构域。因此，N- 连接糖基化位点 N-490 对于适当的 sHASEGP 活性并不是必需的。

[0045] sHASEGP 的 N- 连接糖基化作用对于它们的催化活性和稳定性是至关重要的。尽管改变修饰糖蛋白的聚糖的类型会对蛋白质的抗原性、结构折叠、溶解性和稳定性产生巨大的影响，然而大部分的酶并不被认为为了最佳酶活性而需要糖基化作用。就此而言，sHASEGPs 因而是独特的，去除 N- 连接糖基化作用可能导致透明质酸酶活性几乎完全失活。N- 连接聚糖的存在对于产生活性的 sHASEGP 是至关重要的。本发明包括了适于将至关重要的 N- 连接糖基化残基引入 sHASEGP 的蛋白质表达系统。此外，本发明也包括在能够引入 N- 连接聚糖的提取物存在的条件下，引入去糖基化的 sHASEGP 多肽。在本发明的一个方面，描述了用唾液酸化 (sialation) 加帽的复杂糖基化作用，而用游离甘露糖残基加帽的其它糖基化作用也被考虑到。优选地，唾液酸残基被发现于 sHASEGP 的 N- 连接糖基化作用的末端残基中。

[0046] N- 连接的寡糖分为几个主要的类型（甘露寡糖 (oligomannose)、复合的、杂合的、硫酸化的），它们都通过在 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 序列（其中 Xaa 不是 Pro）中的 Asn 残基的酰胺氮附着于 (Man)3-GlcNAc-GlcNAc- 核心。已经报道过凝集蛋白 C 在 -Asn-Xaa-Cys- 位点的糖基化作用。在测序期间，N- 连接位点常常可由“空白 (blank)”循环的出现而间接指示出来。可以在由 PNGase F 释放寡糖之后，进行阳性鉴定，PNGase F 将糖基化 Asn 转变为 Asp。PNGase F 进行释放之后，N- 连接的寡糖可以用 Bio-Gel P-6 层析进行纯化，对寡糖收集物进行制备型高 pH 阴离子交换层析 (HPAEC)(Townsend et al., (1989)Anal. Biochem.182,1-8)。某些寡糖异构体可以用 HPAEC 分离。在 HPAEC 层析谱中海藻糖残基将较早地变换洗脱位置，而其他唾液酸残基将会增加滞留时间。其寡糖结构已知的糖蛋白

(例如牛胎球蛋白、α-1酸性糖蛋白、卵白蛋白、RNAse B、转铁蛋白)被同时进行处理,这将方便寡糖峰的指认。收集到的寡糖可以用成分分析和甲基化连接分析的组合方法进行表征(Waegheet al.,(1983)Carbohydr Res.123,281-304.),利用NMR光谱术来测定端基异构构造(anomeric configurations)(Van Halbeek(1993)in Methods Enzymol 230)。

[0047] 本发明也提供了sHASEGP的制剂。sHASEGPs可以配制成冻干的形式和稳定化的溶液。含有特定的金属离子诸如钙、镁或钠的制剂,可以用于在中性pH时获得最佳活性。除了稳定化的溶液制剂外,缓慢释放的制剂也被考虑到,其可以用于延长去除糖胺聚糖的过程。还提供了试剂盒,其提供了带有sHASEGP的预先包装好的注射器,以便在眼内外科操作和其他小体积操作中给予小体积的sHASEGP。本发明也提供了可离体用于人工再生技术程序(artificial reproductivetechnology procedures)的平衡盐制剂(Balanced salt formulations)。

[0048] 本发明也提供了将sHASEGP用于去除糖胺聚糖的方法。sHASEGP通过降解糖胺聚糖,在间隙中打开通道,使得尺寸小于500nm的分子得以扩散。取决于剂量和制剂,这些通道可保持24-48小时。此种通道可以被用来协助外源添加的分子的扩散,所述外源添加的分子例如流体、小分子、蛋白质、核酸和基因治疗载体和其他尺寸小于500nm的分子。

[0049] sHASEGPs也可以被用于去除过量的糖胺聚糖,诸如在缺血再灌注、炎症、动脉硬化、水肿、癌症、脊髓损伤和其他形式的创伤之后出现的那些糖胺聚糖。在一些情况下,sHASEGP可以通过静脉灌输被全身性地传送。当局部位置不能到达时,可能是有好处的,例如心脏或脑或在播散性肿瘤的情况下,其中,疾病是全身性的。相对于缺少末端唾液酸的天然透明质酸酶,超唾液酸化的sHASEGP可优选用于增加血清半衰期和分布。

[0050] 在某些情形中,诸如在脊髓损伤、青光眼和妆容处理的情形中,优选进行持续的传送。

[0051] 在其他适应症中,优选单次短期作用剂量(single short acting dose)。暂时地去除糖胺聚糖可以被用来增强将溶液和药物传送入间质空间。这对于麻醉剂的扩散是有用的,对于治疗性流体、分子和蛋白质的给药也是有用的。在sHASEGP存在的条件下,分子的皮下给药和肌内给药也帮助它们更快地分布于全身。当静脉内途径不能被利用或需要分子更快地进行全身性传送时,此种方法是非常有用的。其他大分子诸如因子VIII——其在皮下给药时的生物利用度很差——的传送可以通过与sHASEGP一起注射来完成,从而增加它们的可利用度。

[0052] 也提供了使用sHASEGP来酶促地去除卵母细胞周围的卵丘(积云)基质(cumulus matrix)。使用提取得到的透明质酸酶的不含毒性污染物的纯化sHASEGP来去除卵丘基质,可使得卵母细胞以更强的存活能力被更温和地收回。而且,sHASEGP可以在不使用携带病毒和其他病原体诸如可传递的海绵状脑病的牛提取物或其他生物体的情况下进行制备。

[0053] 用于眼内用途的小体积的sHASEGP的注射,也可以应用于较小的空间。SHASEGPs可以被注射入眼睛的眼睛前房,以去除在手术期间被施用的过量的粘弹性底物。sHASEGP的眼内注射也可以被用于降低青光眼中的眼内压、溶解玻璃体聚集物或“漂浮物”、清除玻璃体出血,用于治疗黄斑变性、促进糖尿病视网膜病变中的玻璃体视网膜脱离、用于与其他酶相混合来促进角膜经矫正镜片的再塑。将会认识到,在一些情况下,sHASEGP诸如聚乙二醇化的sHASEGP的持续长时间的使用会是有利的。

[0054] sHASEGP 与其他物质组成的联合制剂 (co-formulations) 也被考虑用作注射笔 (injectable pens),以用于少量的或快速的皮下给药。可以被配制的例子诸如 Epipent ®、胰岛素和其他流体。本发明的方法包括,在给予其他治疗性分子之前、同时或之后,给予 sHASEGP 多肽或含有 sHASEGP 的药物组合物。sHASEGP 可以在与其他治疗分子的给药位点不同的位点给药,或 sHASEGP 可以在与其他治疗分子的给药位点相同的位点给药。

[0055] 因此,本发明提供了命名为 sHASEGP 的真核细胞分泌型中性活性透明质酸酶糖蛋白家族、以及其功能结构域,特别是其透明质酸酶 (或催化) 结构域、突变蛋白和其他衍生物和类似物。也提供了编码 sHASEGPs 的核酸。此外,还提供了所述 sHASEGP 的制剂和所述 sHASEGP 在治疗疾病中的治疗用途和作为组织修饰酶的用途。

附图简述

[0056] 图 1 是 sHASEGP 载体 HZ24 的载体图。

发明详述

[0057] A. 定义 :除非另外指出,本文所使用的技术和科学术语与本发明所属技术领域技术人员的常规理解具有相同的含义。除非另外指出,在本文的全部公开内容中所引用的所有专利、专利申请、公开的申请和出版物、Genbank 序列、网址和其他公开材料通过引用方式将其整体并入本文。如果对于本文中的术语有许多定义,以这部分中的定义为主。

[0058] 当引用 URL 或其他此种标识或编址时,应该理解的是,此种标识可以变化,因特网上的特定信息可以来来往往,但是通过搜索因特网可以找到等同的信息。因此,所述的引用证明了信息是可利用的且是公开传播的。

[0059] 如本文中所使用的,除非另外指出,任何保护基团、氨基酸和其他化合物的缩写依据它们的常规用法、标识缩写或 IUPAC-IUB Commission on BiochemicalNomenclature(参见 (1972)Biochem.11 :942-944)。

[0060] 如本文中所使用的,真核透明质酸酶是指各种不同家族的糖胺聚糖内切氨基葡萄糖苷酶,其中,透明质酸酶中的谷氨酸残基通过酸 - 碱催化机制水解透明质酸和硫酸软骨素的 β -1,4 键。

[0061] 特别感兴趣的是哺乳动物的 sHASEGP,包括人来源的 sHASEGP。本领域技术人员将认识到,一般来说,在多肽的非实质性区域的单个氨基酸替代基本上不改变生物学活性 (参见如 Watson et al., (1987)Molecular Biology of the Gene,4thEdition, The Benjamin/Cummings Pub.co., p.224)。

[0062] 如本文中所使用的,膜锚定 sHASEGP(membrane anchored sHASEGP) 是指膜锚定的透明质酸酶家族,其具有本文中描述的共同结构特征。

[0063] 如本文中所使用的,可溶性透明质酸酶 (soluble hyaluronidase) 是指在生理条件下具有溶解性的多肽。可溶性 HASEGP 例如可以通过它分配进入加温到 37℃的 Triton X-114 溶液的水相而被辨别 (Bordier et al J Biol Chem.1981Feb 25 ;256(4) :1604-7)。另一方面,脂锚定 HASEGP(Lipid anchored HASEGP) 将分配进入富含去污剂的相,但在用磷脂酶 C 处理后,将分配进入缺乏去污剂的相或水相中。

[0064] 因此,在对例如“sHASEGP”进行引用时,包括了由 sHASEGP 基因家族编码的所有糖

蛋白，包括但不限于：人 sHASEGP、小鼠 sHASEGP，或从任何其他来源获得的等同分子，其或者合成制备而得，或者显示出同样的活性。示范性的 sHASEGP 和 / 或其结构域的编码核酸分子序列和编码的氨基酸序列描述于例如 SEQ ID NO:4 中。该术语也包括具有氨基酸替代的 sHASEGP，所述替代基本上不改变每一成员的活性，该术语也包含其拼接变体 (splice variants)。合适的替代，包括——尽管不一定是——氨基酸的保守替代，是本领域技术人员已道的，并且这样的替代可以在不消除所得分子的生物活性诸如催化活性的情况下进行。

[0065] 如本文中所使用的，在本文中无论什么时候被引用时，sHASEGP 都包括至少一个或所有或任何组合的下述物质：由 SEQ ID NO.6 中阐述的核苷酸序列编码的多肽，或由包括编码 SEQ ID No.1 的氨基酸 1-509 的核苷酸的核苷酸序列编码的多肽；由在低、中等或高严紧型条件下与 SEQ ID NO.6 中所述的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的多肽；包括 SEQ ID No.1 的氨基酸 1-509 所述的氨基酸序列的多肽；包括与 SEQ ID No.1 中所述的氨基酸序列或 SEQ ID No.4 中的氨基酸 1-448 的序列具有至少约 60％、70％、75％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或 99％序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0066] 特别地，提供了 sHASEGP 多肽，其具有 SEQ ID No.4 所示的透明质酸酶结构域。该多肽是单链多肽或双链多肽。本发明也提供了保留有透明质酸酶活性的其更小的部分。sHASEGPs 的透明质酸酶结构域在尺寸上和构成上有所变化，可以包括在表面环 (surface loops) 上的插入和缺失。因此，对于本文的目的，催化结构域是 sHASEGP 的一部分，如本文中所定义，并且与先前已被鉴定的其他透明质酸酶样序列 (hyaluronidase like sequences) 诸如 HYAL1、HYAL2、HYAL3 的结构域相同源；然而，还未发现，分离的单链形式的人透明质酸酶结构域能在体外测定中发挥功能。对活性而言所必需的天冬氨酸和谷氨酸残基存在于保守的基序 (motifs) 中。

[0067] 如本文中所使用的，“可溶性 sHASEGP 的中性透明质酸酶结构域 (neutralhyaluronidase domain of a soluble sHASEGP)”是指 sHASEGP 的 β-1,4 内切氨基葡萄糖苷酶结构域，其在中性 pH 中显示出透明质酸酶活性，在所述的条件下是可溶性的，并且与透明质酸酶糖基 - 水解酶家族结构域具有同源性和共同的结构特征，但在羧基末端含有额外的序列，这对于中性条件下的活性是必需的。因此，它至少是在标准的体外分析评价中显示出透明质酸酶活性并保留可溶性的结构域的最小化的部分。本文中所考虑的是这样的透明质酸酶结构域和其催化活性部分。本发明也提供了截短形式的透明质酸酶结构域，包括其最小的片段，它以单链形式发挥催化作用。

[0068] 在本文中无论什么时候被引用，sHASEGP 的透明质酸酶结构域都包括下述多肽中的至少一个或所有或任何组合或催化活性部分：包括 SEQ ID No.1 所述的氨基酸序列的 N- 连接糖蛋白多肽；由在低、中等或高严紧型条件下与 SEQ ID NO.6 中所述的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的多肽；包括 SEQ ID No.1 中所述的氨基酸序列的多肽；包括与 SEQ ID No.1 中所述的氨基酸序列具有至少约 70％、75％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或 99％序列同一性的氨基酸序列的多肽，和 / 或由 sHASEGP 的拼接变体编码的多肽的透明质酸酶结构域。

[0069] 因此，对于本文的目的，透明质酸酶结构域是 sHASEGP 的一部分，如本文中所定

义，并且与其他 sHASEGP 的结构域同源。对于透明质酸酶家族的更大的分类的酶，sHASEGP 催化结构域享有高度的氨基酸序列同一性。对于活性所必需的 Asp 和 Glu 残基存在于保守基序中。

[0070] 至于活性形式，是指在体内和 / 或体外具有活性的形式。如本文中所描述的，透明质酸酶结构域也能以可溶的分泌的糖蛋白的形式存在。本文已经显示，至少在体外，单链形式的 sHASEGP 和其催化结构域或酶活性部分（通常 C- 末端截短）显示出透明质酸酶活性。因此，本文中提供的是分离形式的 sHASEGP 的透明质酸酶结构域，以及它们在体外药物筛选分析中的应用，所述体外药物筛选分析用于鉴定调节其活性的试剂。

[0071] 如本文中所使用的，sHASEGP 的催化活性结构域是指中性活性的内切氨基葡萄糖苷酶结构域，如通过针对糖胺聚糖底物的体外活性所限定的。

[0072] 感兴趣的 sHASEGPs 包括那些在体内和体外对硫酸软骨素和硫酸软骨素蛋白聚糖 (CSPG′ s) 具有活性的 sHASEGPs ；和那些对透明质酸具有活性的 sHASEGPs。如本文中所使用的，人 sHASEGP 是由存在于人基因组中的核酸诸如 DNA 编码的 sHASEGP，包括所有的等位基因变体和保守变异，只要它们不是在其他哺乳动物中发现的变体就可以。

[0073] 如本文中所使用的，编码 sHASEGP 的透明质酸酶结构域或其催化活性部分的核酸可解释为只编码所述单链透明质酸酶结构域或其活性部分的核酸，该核酸不编码作为连续序列的 sHASEGP 的其他相邻部分。

[0074] 如本文中所使用的，“疾病 (disease)”或“紊乱 (disorder)”指由例如感染或遗传缺陷引起的生物体中的病理状态，并表征为可检测的症状。

[0075] 如本文中所使用的，拼接变体 (splice variant) 是指对基因组核酸诸如 DNA 的初级转录物进行不同的加工而产生的变体，通过所述的不同的加工可以产生一种以上类型的 mRNA。本文中提供了 sHASEGPs 的拼接变体。

[0076] 如本文中所使用的，sHASEGP 蛋白的透明质酸酶结构域是指显示出中性内切氨基葡萄糖苷酶活性的 sHASEGP 透明质酸酶结构域。因此，它至少是蛋白质的最小的部分，其显示出用标准的体外分析所评价的内切氨基葡萄糖苷酶活性。示范性的人透明质酸酶结构域包括 SEQ ID No.4 所述的氨基酸序列的至少一个足以显示出内切氨基葡萄糖苷酶活性的部分。

[0077] 本发明也考虑了这样的核酸分子，其编码在体外透明质酸酶分析中具有内切氨基葡萄糖苷酶活性的多肽，并且与全长的 sHASEGP 多肽透明质酸酶结构域具有至少 70％、75％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或 99％的序列同一性，或其沿着它们的全长或沿着全长的至少约 70％、80％或 90％与编码透明质酸酶结构域的核酸杂交，特别是在中等，通常为高严紧的条件下杂交。

[0078] 对于透明质酸酶结构域，在 N- 末端区域的残基可能对活性是至关重要的，但不是充分的。本文显示，sHASEGP 的透明质酸酶结构域是具有催化活性的。因此，为了具有活性，透明质酸酶结构域通常需要 N- 末端氨基酸 ；C- 末端部分可以被截短，直到最后的半胱氨酸残基还需要额外的氨基酸来获得最佳活性。通过用评价催化切割的体外分析来测试多肽的透明质酸酶活性，可以被截去的数量可以经验性地被确定。

[0079] 因此，本发明考虑了透明质酸酶结构域特别是单链结构域的较小部分，其保留透

明质酸酶活性。这样的较小的形式一般是透明质酸酶结构域的 C- 端截短形式。透明质酸酶结构域在尺寸和构成上有所变化，包括在表面环中的插入和缺失。这样的结构域显示出保守的结构，包括至少一个结构特征，诸如质子供体，和 / 或内切氨基葡萄糖苷酶的透明质酸酶结构域的其他特征。因此，对于本文目的，透明质酸酶结构域是 sHASEGP 的一个单链部分，如本文中所述，但在它的结构特征和序列类似性或同源性的保留方面与其他透明质酸酶样序列的透明质酸酶结构域具有同源性。作为单链，该糖蛋白显示出透明质酸酶活性。

[0080] 如本文中所使用的，同源性是指约大于 25％的核酸序列同一性，诸如 25％、40％、60％、70％、80％、90％或 95％。如果有必要的话，百分同源性将被明确说明。术语“同源性 (homology)”和“同一性 (identity)”常常交换使用。总之，将序列进行联配比对，以便获得最高级别的匹配。（参见如 Computational MolecularBiology，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 和 Sequence Analysis Primer，Gribskov，M. and Devereux，J.，eds.，M Stockton Press，New York，1991；Carillo et A1.(1988)et al.(1988)Slam JApplied Math 48)：1073)。

[0081] 依照序列同一性，保守氨基酸的数目通过标准的联配算法程序而被确定，其中使用由各供应商设立的默认缺口罚值。基本上同源的核酸分子将通常沿着感兴趣的核酸分子的全长或沿着全长的至少约 70％、80％或 90％，在中等严紧度或高严紧度的条件下发生杂交。本发明也考虑了这样的核酸分子，其包含了简并密码子来替代杂交核酸分子中的密码子。

[0082] 两种核酸分子是否具有至少例如 80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或 99％“同一性”的核苷酸序列，可以使用已知的计算机算法诸如“FASTA”程序来确定，使用例如 Pearson et al(1988)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]：2444 中的默认参数（其它程序包括 GCG 程序包 (Devereux，J.，et al，Nucleic Acids Research12：387(1984))，BLASTP，BLASTN，FASTA(Atschul，[S.][F.，][ET AL，J MOLECBIOL 215]：403(1990)；Guide to Huge Computers，Martin J.Bishop，[ED.，]AcademicPress，San Diego，1994，[CARILLO ETA/.](1988)SIAM J Applied Math 48：1073)。例如，美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 数据库的 BLAST 功能可以被用于确定同一性。其他商业的或公用的程序包括 DNASTAR" MEGALIGN" PROGRAM(Madison，WI) 和威斯康星大学 GeneticsComputer Group(UWG)" Gap" 程序 (Madison WI))。蛋白质和 / 或核酸分子的百分同源性或同一性可以例如通过使用 GAP 计算机程序来比较序列信息而得以测定，GAP 计算机程序例如 Needleman et al.(1970)，J Mol Biol.48：443，按照 Smith andWaterman Adv.Appl.Math(1981)2：482 的修改。简言之，GAP 程序将相似性定义为，相似的联配符号（即，核苷酸或氨基酸）的数目除以两条序列中较短的一条中的符号总数。GAP 程序的默认参数可以包括：(1) 一元比较阵列 (unarycomparison matrix)（对于同一的情况，所包含的值为 1，对于非同一的情况，值为 0) 和 Gribskov et al(1986)Nucl.Acids Res.14：6745 的加权比较阵列 (weightedcomparison matrix)，如 Schwartz and Dayhoff，eds.，Atlas Of Protein Sequence AndStructure，National Biomedical Research Foundation，

pp.353-358(1979) 描述 ;(2) 每一缺口的罚值为 3.0,每一缺口中的每一符号的附加罚值为 0.10 ;和 (3) 末端缺口无罚值。因此,如本文中所使用的,术语“同一性”代表了受测和参考多肽或多核苷酸之间的比较。

[0083] 如本文中所使用的,术语“至少 90%同一性”是指相对于参考多肽的 90 至 99.99 的百分同一性。90%或更高水平的同一性表明这样一个事实,示例性地假设 100 个氨基酸长的受测和参考多核苷酸被比较的话,在受测多核苷酸中不超过 10%(即 100 个中的 10 个)的氨基酸与参考多肽的氨基酸不同。在受测和参考多核苷酸之间,可以进行类似的比较。这样的差异可以体现为在全长的氨基酸序列中随机分布的点突变,或可以它们可以聚集在变化长度的一个或多个位置,最高可至所允许的最大值,例如 10/100 的氨基酸差异(约 90%同源性)。差异可以定义为核酸或氨基酸的替代或缺失。在同源性或同一性的水平超过约 85-90%时,结果应该不依赖于程序和缺口参数设置。这样的高水平的同一性可以很容易进行评估,通常不需要依靠软件。

[0084] 如本文中所使用的,引物是指包含 2 个或更多个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的寡核苷酸,通常大于 3 个,由所述引物可以启动引物延伸产物的合成。有助于合成的实验条件包括存在核苷三磷酸和用于聚合反应和延伸的试剂,诸如 DNA 聚合酶,以及合适的缓冲液、温度和 pH。

[0085] 如本文中所使用的,动物包括任何动物,诸如但不限于山羊、牛、鹿、绵羊、啮齿类动物、猪和人。非人动物是指除了人之外的被考虑到的动物。所提供的 sHASEGPs 来自任何来源,动物、植物、原核生物和真菌。大部分的 sHASEGP 来源于动物,包括哺乳动物来源。

[0086] 如本文中所使用的,遗传疗法涉及将异源核酸例如 DNA 转移到哺乳动物特别是人的某些细胞,即靶细胞,所述动物具有此疗法所要解决的紊乱或症状。核酸例如 DNA 以这样的方式导入所选择的靶细胞,即,使得该异源核酸例如 DNA 被表达并且所编码的治疗性产物由此产生。

[0087] 可选择地,异源核酸,例如 DNA,可以以某方式介导编码治疗性产物的 DNA 的表达,或它可以编码某产物,例如肽或 RNA,其以某方式直接或间接地介导治疗性产物的表达。遗传疗法也可以被用来传送编码某基因产物的核酸,其替代缺陷的基因,或补充由导入有所述核酸的哺乳动物或细胞产生的基因产物。导入的核酸可以编码治疗化合物,诸如其生长因子抑制剂,或其肿瘤坏死因子或抑制剂,诸如受体,这些治疗化合物一般情况下不产生于哺乳动物宿主中,或不以治疗上有效的量或不在治疗上有用的时间产生。在导入到病痛的宿主的细胞中之前,编码治疗性产物的异源核酸例如 DNA 可以被修饰,以增强或改变该产物或其表达。遗传疗法也可以涉及传送基因表达的抑制剂或阻抑物或其他调节物。

[0088] 如本文中所使用的,异源核酸是这样的核酸,该核酸和(如果 DNA 是编码 RNA)蛋白质在正常情况下不由表达所述异源核酸的细胞在体内产生,或者异源核酸介导内源性核酸例如 DNA 的表达或编码改变内源性核酸例如 DNA 的表达的调节物,所述介导或改变是通过影响转录、翻译或其他可调节的生物化学过程来实现的。异源核酸,例如 DNA,也可以称为外源核酸,例如 DNA。本领域技术人员将其识别为或考虑为对于表达它的细胞来说是异源的或外来的任何核酸例如 DNA,均包括在本文的异源核酸之内 ;异源核酸包括外源性加入的核酸,其也被内源性表达。异源核酸的例子包括,但不限于 :编码可追踪的标记蛋白的核酸,所述的可追踪的标记蛋白例如赋予药物抗性的蛋白 ;编码治疗上有效的物质的核酸,所

述的治疗上有效的物质例如抗癌剂、酶和激素；和编码其他类型的蛋白例如抗体的核酸，例如 DNA。由异源核酸编码的抗体可以分泌或表达在已经导入有该异源核酸的细胞的表面。

[0089] 通常，异源核酸在遗传上对于导入它的细胞来说不是内源性的，但是已经从别的细胞获得或通过合成制备得到。

[0090] 一般地，尽管不是必需的，这样的核酸编码的 RNA 和蛋白质在正常情况下不由表达它的细胞产生。

[0091] 如本文中所使用的，治疗上有效的产物是由异源核酸——通常是 DNA——编码的产物，一旦将该核酸导入到宿主中后，产物被表达，可缓解或消除作为遗传疾病或获得性疾病的表现的症状，或者该产物治愈该疾病。

[0092] 如本文中所使用的，糖蛋白基本上由透明质酸酶结构域组成的这一叙述是指，仅仅多肽的 sHASEGP 部分是透明质酸酶结构域或其催化活性部分。该多肽可以任选地——并且一般将包括——额外的非 sHASEGP 衍生的氨基酸序列。

[0093] 如本文中所使用的，结构域 (domain) 是指分子例如糖蛋白或编码核酸的某部分，其在结构上和 / 或功能上不同于该分子的其他部分。

[0094] 如本文中所使用的，透明质酸酶 (hyaluronidase) 是指催化糖胺聚糖的水解的酶。

[0095] 为了清楚起见，引用透明质酸酶时，是表示所有的形式，特定的形式将被特别地指出。对于本文的目的，透明质酸酶结构域包括膜结合的和可溶形式的 sHASEGP 蛋白。

[0096] 如本文中所使用的，核酸包括 DNA、RNA 和其类似物，包括蛋白核酸 (protein nucleic acids，PNA) 和其混合物。核酸可以是单链或双链的。当指探针或引物时——其用可检测的标记诸如荧光或放射性标记任选地标记，通常考虑单链分子。这样的分子通常是这样的长度，即，其使得在探察或起动一个文库时它们的靶标是统计上独特的或低拷贝数的 (通常小于 5，一般小于 3)。一般地，探针或引物含有与感兴趣的基因互补或相同的至少 14、16 或 30 个连续的序列。探针和引物的长度可以是 10、20、30、50、100 或更多的核苷酸。

[0097] 如本文中所使用的，编码 sHASEGP 片段或部分的核酸是指仅编码所述的 sHASEGP 片段或部分，但不编码 sHASEGP 的其他相邻部分的核酸。

[0098] 如本文中所使用的，异源核酸与调节或效应 (effector) 核苷酸序列，例如启动子、增强子、转录和翻译终止位点和其他信号序列的有效连接 (operativelinkage) 是指此种核酸例如 DNA 和此种核苷酸序列之间的关系。例如，异源 DNA 与启动子的有效连接是指 DNA 和启动子之间的一种物理关系，依据这样的关系，此种 DNA 的转录由 RNA 聚合酶从启动子处启动，所述 RNA 聚合酶特异性地识别、结合并转录阅读框中的 DNA。因此，有效连接或操作性地结合是指，核酸例如 DNA 与调节和效应核苷酸序列例如启动子、增强子、转录和翻译终止位点或其他信号序列之间的功能关系。例如，DNA 与启动子之间的有效连接是指 DNA 和启动子之间的物理和功能关系，依据这样的关系，此种 DNA 的转录由 RNA 聚合酶从启动子开始启动，所述 RNA 聚合酶特异性识别、结合并转录 DNA。为了优化表达和 / 或体外转录，可能有必要去除、添加或改变克隆的 5’非翻译部分，以消除多余的、潜在不合适的选择性翻译起始 (即，起始) 密码子或其他序列，这样密码子或其他序列或在转录水平或在翻译水平干扰或减少表达。可选择地，共有的核糖体结合位点 (参见如 Kozak J. Biol. Chem. 266：

19867-19870(1991)) 可以紧挨着起始密码子的 5′ 端插入,从而可以增强表达。对此种修饰的愿望(或需要)可以经验性地被确定。

[0099] 如本文中所使用的,与 RNA 的至少一部分相互补的序列,称为反义寡核苷酸,是指这样的序列,其与 RNA 充分互补,能与 RNA 杂交,一般是在中等或高严紧型条件下杂交,形成稳定的双螺旋;在双链 sHASEGP 反义核酸的情况下,可以测试双螺旋 DNA(或 dsRNA) 的单链,或可以分析三股螺旋的形成。杂交的能力取决于互补的程度和反义核酸的长度。一般地,杂交核酸越长,它能够容纳的与 sHASEGP 的编码 RNA 的错配越多,并且依然能形成稳定的双螺旋(或三股螺旋,如果可能的话)。通过使用标准的程序去测定杂交复合体的熔点,本领域技术人员可以确定错配的可容忍程度。

[0100] 至于本文目的,只要所得到的蛋白质显示有透明质酸酶活性,氨基酸替代可以在任何的 sHASEGPs 和其透明质酸酶结构域进行。所考虑的氨基酸替代包括保守性替代,例如表 1 中所述的那些,其不会消除蛋白水解活性。如本文中所描述的,也考虑了改变蛋白质的特性的替代,例如去除切割位点和其他此类位点。此类替代一般是非保守的,但会容易地被本领域技术人员完成。

[0101] 合适的氨基酸保守性替代是本领域技术人员已知的,一般可以在不改变所得分子的生物活性如酶活性的情况下进行。本领域技术人员将认识到,一般来说,在多肽的非必需区域进行的单个氨基酸的替代基本上不会改变生物学活性(参见如 Watson et al.Molecular Biology of the Gene,4th Edition,1987,TheBenjamin/Cummings Pub. co.,p.224)。同样包括在该限定中的是,sHASEGP 的催化活性片段,特别是单链透明质酸酶部分。可以进行的保守的氨基酸替代例如下面表 1 所述。

[0102] 表 1 原始残基保守性替代 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 ;GluMet(M)Leu ;Tyr ;Ile ;NLe Val Ornitine Lys ;Arg Phe(F)Met ;Leu ;Tyr Ser(S)ThrThr(T)Ser Trp(W)Tyr Tyr(Y)Trp ;Phe Val(V)ILE ;Leu ;Met ;Nle ;Nv。其他的替代也是允许的,并可以经验性地确定,或根据已知的保守替代来确定。

[0103] 如本文中所使用的,Abu 是 2- 氨基丁酸 ;Orn 是鸟氨酸。如本文中所使用的,本文中出现的各种氨基酸序列中的氨基酸是根据它们公知的三字母或一字母缩写来表示的。出现在各种 DNA 片段中的核苷酸,是用本领域常规使用的标准的单字母标识来表示的。

[0104] 如本文中所使用的,基于公开于本文中的核苷酸序列的探针或引物,包括 SEQ ID NO.6 的至少 10、14,通常至少 16 个连续的核苷酸序列,SEQ ID NO.6 的至少 30、50 或 100 个连续的核苷酸序列的探针。用于特定杂交的探针或引物的长度是感兴趣的基因组的复杂度的函数。

[0105] 如本文中所使用的,通过给予特定的药物组合物而导致的特定紊乱的症状的缓解是指归因为组合物的给予或与组合物的给予相关的任何的减轻,无论是永久的还是暂时的,持续的还是瞬时的。

[0106] 如本文中所使用的,反义多核苷酸是指合成的核苷酸碱基序列,其与 mRNA 或双链 DNA 的有义链相互补。有义和反义多核苷酸的混合物在合适的条件下导致两分子的结合或杂交。当这些多核苷酸与 mRNA 结合(杂交)时,蛋白质合成(翻译)的抑制发生。当这些

多核苷酸结合到双链 DNA 时，RNA 合成（转录）的抑制发生。

[0107] 所产生的翻译和/或转录的抑制作用抑制了有义链编码的蛋白质的合成。反义核酸分子通常含有足够数目的核苷酸来特异性地结合目标核酸，通常有至少 5 个连续的核苷酸，常常至少 14 或 16 或 30 个连续的核苷酸或修饰的核苷酸，与编码感兴趣的基因的核酸分子的编码区域相互补，例如与编码 sHASEGP 的单链透明质酸酶结构域的核酸互补。

[0108] 如本文中所使用的，阵列是指元素例如抗体的集合，其含有 3 个或更多的成员。可寻址阵列 (addressable array) 是这样的阵列，在其中，阵列的成员一般可以通过在固相支持物上的位置而被鉴定。因此，一般而言，阵列的成员被固定在固相表面的离散的可鉴定的位点上。

[0109] 如本文中所使用的，抗体指免疫球蛋白，其是天然的或者部分或全部合成产生的，包括它们的保留有抗体特异性结合能力的任何衍生物。因此，抗体包括具有结合结构域的任何蛋白质，所述结合结构域与免疫球蛋白结合结构域同源或基本上同源。抗体包括任何免疫球蛋白的成员，包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0110] 如本文中所使用的，抗体片段是指抗体的任何衍生物，其小于全长抗体，保留了全长抗体的特异性结合能力的至少一部分。抗体片段的例子包括，但不限于 Fab、Fab′、F(AB)2、单链 Fvs(scFV)、FV、dsFV 双功能抗体和 Fd 片段。片段可以包括例如通过二硫桥连接在一起的多条链。抗体片段通常含有至少 50 个氨基酸，典型地含有至少 200 个氨基酸。

[0111] 如本文中所使用的，Fv 抗体片段是由一个可变重链结构域 (VH) 和一个可变轻链结构域通过非共价相互作用联系在一起而组成。

[0112] 如本文中所使用的，dsFV 是指具有工程制造的分子间二硫键的 Fv。

[0113] 如本文中所使用的，F(AB)2 片段是用胃蛋白酶在 pH 4.0-4.5 消化免疫球蛋白而得到的抗体片段；它可以通过重组方法来表达，从而产生等同的片段。

[0114] 如本文中所使用的，Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白而得到的抗体片段；它们可以通过重组方法被表达，从而产生等同的片段。

[0115] 如本文中所使用的，scFVs 是指含有以任何顺序通过多肽连接子共价联系在一起的可变轻链 V 和可变重链 (VH) 的抗体片段。该连接子的长度可以使两个可变结构域在基本上无干扰的情况下连接起来。所述的连接子包括 (Gly-Ser)n 残基，其中遍布着一些 Glu 或 Lys 残基，以增加溶解性。

[0116] 如本文中所使用的，人源化抗体是指经修饰而包括人氨基酸序列的抗体，这样，施用于人时不会引起免疫应答。制备此种抗体的方法是已知的。例如，为了产生此种抗体，表达单克隆抗体的杂交瘤或其他原核或真核细胞诸如大肠杆菌或 CHO 细胞，可以用重组 DNA 技术来改变以表达这样的抗体，在其中非可变区的氨基酸组成是基于人抗体。已经设计出计算机程序来鉴定这样的区域。

[0117] 如本文中所使用的，双功能抗体 (diabodies) 是二聚体的 scFV；双功能抗体通常具有比 scFVs 短的肽连接子，且它们一般是二聚体化。

[0118] 如本文中所使用的，通过使用重组 DNA 方法的重组手段的生产，是指使用已知的分子生物学方法来表达由克隆 DNA 编码的蛋白质。

[0119] 如本文中所使用的，术语“评价 (assessing)”旨在包括定量和定性测定，这是为了获得存在于样品中的 sHASEGP 或其结构域的活性的绝对值，也可为了获得表征活性的水平

的指数、比率、百分比、视觉结果或其他值。评价可以是直接的或间接的，实际被检测的化学物质当然不必一定是蛋白质水解产物本身，可以例如是其衍生物或一些其他的物质。

[0120] 如本文中所使用的，生物活性是指化合物的体内活性或由于体内给予化合物、组合物或其他混合物而引起的生理应答。因此，生物活性包括此种化合物、组合物和混合物的治疗效果和药物学活性。生物活性可以采用被设计用来测试或应用此种活性的体外系统来观察。因此，对于本文的目的，荧光素酶的生物活性是它的加氧酶活性，一旦底物被氧化之后，便产生光。

[0121] 如本文中所使用的，功能活性是指多肽或其部分，其显示出一种或多种与全长蛋白质相关的活性。

[0122] 功能活性包括，但不限于生物活性、催化或酶活性、抗原性（结合多肽或与多肽竞争来结合抗多肽抗体的能力）、免疫原性、形成多聚体的能力、特异性地结合多肽的受体或配体的能力。

[0123] 如本文中所使用的，共轭物 (conjugate) 指本文中提供的包括一个或多个 sHASEGP 的化合物，其包括 sHASEGP，特别是其单链透明质酸酶结构域和一种或多种靶向试剂 (targeting agents)。这些共轭物包括由重组方法产生的那些共轭物，如融合蛋白；由化学方法产生的那些共轭物，例如通过化学偶联产生的，如通过偶联到巯基基团；以及那些由其他任何方法产生的，其中至少一个 sHASEGP 或其结构域通过连接子直接或间接地连接到靶向试剂。

[0124] 如本文中所使用的，靶向试剂是任何组成部分 (moiety)，例如蛋白质或其有效部分，其特异性地将该共轭物结合于细胞表面受体，这可以使该共轭物或其 sHASEGP 部分内在化。靶向试剂也可以是例如促进或帮助共轭物亲合分离或纯化、将共轭物附着到表面、或检测共轭物或含有共轭物的复合物的试剂。

[0125] 如本文中所使用的，抗体共轭物是指其中的靶向试剂是抗体的共轭物。

[0126] 如本文中所使用的，分子的衍生物或类似物是指从分子衍生而来的一部分或修饰形式的分子。

[0127] 如本文中所使用的，用于治疗特定疾病的化合物的有效量是指这样的量，其足以改善或以某方式减少与疾病相关的症状。这样的量可以以单次剂量被施给或可以依据疗程被施给，并因此产生效果。该数量可以治愈疾病，但通常，是为了改善疾病的症状而施用。反复的施用可能是为了获得理想的症状改善效果所必需的。

[0128] 如本文中所使用的，“等同的 (equivalent)”，当用于两个核酸序列时，是指这两条在研究中的序列编码同样序列的氨基酸或等同的蛋白质。当“等同的”一词用于两个蛋白质或肽时，它是指这两个蛋白质或肽具有基本上相同的氨基酸序列，只有基本上不改变蛋白质或肽的活性或功能的氨基酸替代（例如但不限于保守替代，诸如上面表 1 所述的）。当“等同的”一词用于性质时，该性质不必以相同的程度存在（例如，两个肽对于相同类型的酶活性，可以显示出不同的速率），但活性通常是基本上相同的。“互补的 (Complementary)”，当用于两条核苷酸序列时，是指这两条核苷酸序列能够杂交，通常在相对的核苷酸之间具有小于 25%、15%、5% 或 0% 的错配。如果必要的话，互补的百分比将被指明。通常，所选择的这两个分子可以在高严紧的条件下杂交。

[0129] 如本文中所使用的，调节蛋白的活性或者基因或核酸的表达的试剂，降低或增加

或者改变蛋白质的活性，或以某方式上调或下调或者改变核酸在细胞中的表达。

[0130] 如本文中所使用的，sHASEGP 活性的抑制剂包括抑制或减少 sHASEGP 的产生、翻译后加工修饰、成熟或膜定位的任何物质，或者干扰或降低其蛋白水解效率——特别是在体外筛选分析中单链形式的蛋白的水解效率——的任何物质。

[0131] 如本文中所使用的，用于治疗或预防肿瘤性疾病的方法是指，任何的症状例如肿瘤、其转移、肿瘤的血管化作用或表征该疾病的其他参数被降低、改善、预防、置于缓解的状态、或维持在缓解的状态。也指肿瘤性疾病和转移的特征 (hallmarks) 可以通过该治疗而被消除、减少或预防。所述特征的非限制性的例子包括基底膜 (basement membrane) 和附近的胞外基质不受控制的降解，内皮细胞迁移、分裂和组织成新的功能化毛细管，以及这样的功能化毛细管的维持。

[0132] 如本文中所使用的，共轭物的药学上可接收的盐、酯或其他衍生物包括任何的盐、酯或衍生物，它们可以由本领域技术人员使用已知的用于这样的衍生化作用的方法容易地制备得到，这样所产生的化合物能够施用于动物或人而基本上没有毒性效应，并且它们或者具有药物学活性或者是药物前体。

[0133] 如本文中所使用的，药物前体是指这样的化合物，其被体内施用之后，被代谢或转化为具有生物活性、药物学活性或治疗活性形式的化合物。为了产生药物前体，药物活性化合物被修饰，以便该活性化合物通过代谢过程被再生。药物前体可以被设计以改变药物的代谢稳定性或运送特征、以掩蔽副作用或毒性、以改善药物的风味，或者以改变药物的其他特征或性质。依据药物动力过程和体内药物代谢的知识，一旦知道了该药学活性化合物，本领域技术人员便可以设计该化合物的药物前体（参见如 Nogrady(1985) Medicinal Chemistry A BiochemicalApproach，Oxford University Press，New York，pages 388-392）。

[0134] 如本文中所使用的，用本文中提供的筛选方法鉴定的药物，是指任何化合物，其是用作治疗剂或用作用于设计治疗剂的先导化合物的候选化合物。此类化合物可以是小分子，包括小的有机分子、肽、肽模拟物、反义分子或 dsRNA，例如 RNAi、抗体、抗体片段、重组抗体和其他此类化合物，其可以充当药物候选者或先导化合物。

[0135] 如本文中所使用的，肽模拟物 (peptidomimetic) 是这样的化合物，其模拟生物活性形式的特定肽的构象和某些立体化学特征。总的来说，肽模拟物被设计用来模拟化合物的某些期望的特性，但不模拟不想要的特性，诸如可导致生物活性构象丧失和键断裂的柔性。肽模拟物可以通过用生物等排物 (bioisosteres) 取代形成不想要的特性的某些基团或键，由生物活性化合物制备得到。生物等排物是本领域技术人员已知的。例如，亚甲基生物等排物 CH2S 已在脑啡肽类似物中被用作酰胺取代（参见如 Spatola(1983)pp.267-357in Chemistry and Biochemistry ofAmino Acids，Peptides，and Proteins，Weistein，Ed.volume 7，Marcel Dekker，NewYork）。吗啡，可以口服给药，是内啡肽的肽模拟物化合物。对于本文的目的，环状肽被包括在肽模拟物之中。

[0136] 如本文中所使用的，启动子区域或启动子元件是指控制与之有效连接的 DNA 或 RNA 的转录的 DNA 或 RNA 片段。启动子区域包括特异性序列，其足以被 RNA 聚合酶识别、结合和起始转录。

[0137] 启动子区域的这一部分被称为启动子。此外，启动子区域包括调控 RNA 聚合酶的

这种识别、结合和转录起始活性的序列。这些序列可以是顺式作用的，或可以对反式作用因子作出反应。依据调控的性质，启动子可以是组成型的或可以调控型的。被考虑用于原核生物的示范性启动子，包括噬菌体 T7 和 T3 启动子。

[0138] 如本文中所使用的，受体是指对于给定的配体具有亲和力的分子。受体可以是天然发生的或合成的分子。受体在本领域也可以指抗－配体 (anti-ligands)。如本文中所使用的，受体和抗－配体是可互换的。受体可以在它们的未加以改变的状态下使用，或作为与其他物质的聚集体使用。受体可以直接地或通过特定的结合物质或连接物而间接地，共价地或非共价地或以物理接触的方式附着到结合组分上。受体的例子包括但不限于：抗体、细胞膜受体表面受体和内在化受体 (internalizing receptors)、单克隆抗体和对诸如病毒、细胞或其他物质、药物、多核苷酸、核酸、肽、因子、凝集素、糖、多糖、细胞、细胞膜和细胞器上的特异性抗原决定簇具有活性的抗血清。

[0139] 受体的例子和使用此类受体的应用的例子，包括但不限于：a) 酶：对微生物的存活至关重要的特定转运蛋白或酶，其可以充当抗生素［配体］选择的靶标；b) 抗体：抗体分子上的与感兴趣的抗原的表位相结合的配体结合位点的鉴定可以被研究；通过模拟抗原表位的序列的测定可以开发出疫苗，其中免疫原是基于一种或多种这样的序列，或可以开发出相关的诊断试剂或化合物，它们可以用于治疗例如自免疫疾病 (auto-immune diseases)；c) 核酸：配体的鉴定，诸如蛋白质或 RNA，结合位点；d) 催化多肽：聚合物，包括能够促进涉及将一种或多种反应物转化为一种或多种产物的化学反应的多肽；这样的多肽一般包括对至少一种反应物或反应中间产物具有特异性的结合位点，以及靠近该结合位点的功能活性，其中，该功能性能够通过化学的方法修饰被结合的反应物（参见美国专利 5,215,899）；e) 激素受体：以高亲和力与受体相结合的配体的确定，可以用于开发激素替代疗法；例如，通过对结合此类受体的配体的鉴定可以开发出控制血压的药物；和 f) 鸦片受体：在脑中结合鸦片受体的配体的确定，可以用于开发出吗啡和相关毒品的上瘾性较弱的替代品。

[0140] 如本文中所使用的，样品是指含有分析物分析所期望的分析物的任何物质。样品可以是生物学样品，例如生物流体或生物组织。生物流体的例子包括尿、血、血浆、血清、唾液、精液、大便、痰、脑脊髓液、眼泪、粘液、精液、羊水或类似物。生物组织是细胞的聚集体，通常是与它们的胞间物质一起形成的特定类型，其构成人、动物、植物、细菌、真菌或病毒结构的结构材料之一，包括结缔组织、上皮组织、肌肉和神经组织。生物组织的例子也包括器官、肿瘤、淋巴结、动脉和个体细胞。

[0141] 如本文中所使用的：在测定错配百分比时的杂交严紧度描述如下：1) 高严紧度：0.1×SSPE，0.1％ SDS，65℃；2) 中等严紧度：0.2×SspE，0.1％ SDS，50℃；3) 低严紧度：1.0×SspE，0.1％ SDS，50℃。本领域技术人员知道选择洗涤步骤对稳定的杂交的选择作用，也知道 SspE 的成分（参见如 Sambrook，E.F.Fritsch，T.Maniatis，in：Molecular Cloning，A Laboratory Manual，Cold spring Harbor LaboratoryPress 1989 Vol 3，p.B.13，也参见描述常规使用的实验室溶液的大量目录）。SspE 是 pH 7.4 的磷酸盐缓冲的 0.18NaCl。进一步地，本领域技术人员知道杂交的稳定性取决于 TmT，它是钠离子浓度和温度的函数 (Tm ＝ 81.5℃ －16.6+0.41(％ G+C)-600/L))，这样，在洗涤条件中仅有的对杂交稳定性至关重要的参数是 SspE（或 SSC）中的钠离子浓度和温度。

[0142] 应该理解的是，使用其它的缓冲液、盐和温度，可以获得等同的严紧度。作为例子而不是为了限制，使用低严紧度的条件的程序如下（也参见 Shilo andWeinberg，Proc. Natl. Acad Sci USA 78：6789-6792(1981)）：含有 DNA 的滤膜在 40℃预处理 6 小时，预处理在含有 35％甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、5mMEDTA、0.1％ PVP、0.1％ Ficoll、1％ BSA 和 500ug/ml 变性鲑鱼精 DNA(10×) 的溶液中进行，SSC 是 1.5M 氯化钠和 0.15M 柠檬酸钠，调节到 pH 7。

[0143] 杂交在同样的溶液中进行，作下述修改：0.02％ PVP、0.02％ Ficoll、0.2％ BSA、100VG/M 精子 DNA、10％ (wt/vol) 葡聚糖硫酸酯和使用 5-20×106cpm 32P-标记的探针。滤膜在杂交混合物中 40℃温育 18-20 小时，然后在 55℃洗涤 1.5 小时，洗涤在含有 2×SSC、25mM Tris-HCl(pH 7.4)、5mM EDTA 和 0.1％ SDS 的溶液中进行。洗涤溶液用新鲜溶液更换，在 60℃再温育 1.5 小时。将滤膜进行斑点干燥 (blotted dry) 并暴露以进行放射自显影。如果必要，滤膜可以在 65-68℃进行第三次洗涤，并再暴露于胶片。可以使用的低严紧度的其他条件是本领域已知的，例如在种间交叉杂交 (cross-species hybridizations) 中所使用的。

[0144] 作为例子而不是为了限制，使用中等严紧度的条件的程序包括但不限于：含有 DNA 的滤膜在 55℃预处理 6 小时，预处理在含有 6×SSC、5×Denhart′ s 溶液、0.5％ SDS 和 100μg/ml 变性鲑鱼精 DNA 的溶液中进行。杂交在同样的溶液中进行，并使用 5-20×10632P 标记的探针。滤膜在 55℃在杂交化合物中温育 18-20 小时，然后在 60℃洗涤 30 分钟，洗涤 2 次，洗涤在含有 1×SSC 和 0.1％ SDS 的溶液中进行。将滤膜进行斑点干燥 (blotted dry) 并暴露以便放射自显影。可以使用的中等严紧度的其他条件是本领域已知的。对滤膜的洗涤在 37℃进行 1 小时，洗涤在含有 2×SSC、0.1％ SDS 的溶液中进行。

[0145] 作为例子而不是为了限制，使用高严紧度的条件的程序描述如下：含有 DNA 的滤膜的预杂交在 65℃进行 8 小时至过夜，预杂交在由 6×SSC、50mMTris-HCl(pH 7.5)、1mM EDTA、0.02％ PVP、0.02％ Ficoll、0.02％ BSA 和 500ug/ml 变性鲑鱼精 DNA 组成的缓冲液中进行。滤膜在 65℃杂交 48 小时，杂交在含有 100ug/ml 变性鲑鱼精 DNA 和 5-20×106CPM 32P 标记探针的预杂交混合物中进行。滤膜的洗涤在 37℃进行 1 小时，洗涤在含有 2×SSC、0.01％ PVP、0.01％ Ficoll 和 0.01％ BSA 的溶液中进行。然后，在放射自显影之前，在 50℃在 0.1×SSC 中洗涤 45 分钟。可以使用的高严紧型的其他条件是本领域熟知的。

[0146] 术语“基本上相同的”或“基本上同源的”或“类似的”随上下文而有所变化，这是相关技术领域的技术人员所能理解的，一般是指至少 60％或 70％，优选至少 80％、85％，或更优选的至少 90％，最优选至少 95％的同一性。

[0147] 如本文中所使用的，与产物基本上相同，是指足够地相似，以至于感兴趣的特性不足以被改变，这样，该基本上相同的产物可以用于替代所述产物。

[0148] 如本文中所使用的，基本上纯化的是指具有足够地匀质的，用标准的分析方法进行测定时似乎没有可易被检测到的杂质，标准的分析方法诸如薄层层析 (TLC)、凝胶电泳和高效液相色谱 (HPLC)，它们被本领域技术人员用来评估此类纯度，或指具有足够的纯度，以至于经过进一步的纯化作用，无法检测到物理和化学特性的改变，诸如物质的酶活性或生物活性的改变。对化合物进行纯化以产生化学上基本上纯的化合物的方法是本领域技术人员所知道的。化学上基本上纯的化合物然而可以是立体异构体或异构体的混合物。在这样

的情况下，进一步的纯化可能增加混合物的比活性。

[0149] 如本文中所使用的，目标细胞（或靶细胞）指体内表达 sHASEGP 的细胞。

[0150] 如本文中所使用的，受测物质（或受测化合物）是指化学上定义的化合物（例如有机分子、无机分子、有机 / 无机分子、蛋白质、肽、核酸、寡核苷酸、脂、多糖、糖类，或这些分子的杂合物诸如糖蛋白等）或化合物的混合物（例如受测化合物文库、天然提取物或培养上清液等），本文中提供了它们对 sHASEGP，特别是包括了透明质酸酶结构域的单链形式或其具有足够活性的部分的效应，这可以通过体外方法例如本文所提供的分析方法进行测定。

[0151] 如本文中所使用的，术语治疗剂、治疗方案、辐射防护剂或化学治疗剂是指常规的药物和药物治疗，包括疫苗，其是本领域技术人员所知道的。辐射防护剂是本领域已知的。

[0152] 如本文中所使用的，治疗是指涉及状况、紊乱或疾病的症状得以改善或发生其他有利改变的任何方式。

[0153] 治疗也包括本文的组合物的任何药物学应用。

[0154] 如本文中所使用的，载体（或质粒）是指用于将异源核酸导入到细胞中以进行表达或复制的独立元件。载体通常保持为附加体 (episomal)，但也可以被设计成可以使得基因或其部分被整合入基因组染色体中。也考虑到人工染色体载体，诸如酵母人工染色体和哺乳动物人工染色体。此类载体的选择和使用对本领域技术人员来说是熟知的。表达载体包括能够表达 DNA 的载体，该 DNA 与调控序列有效连接，所述调控序列诸如启动子区域，其能够影响此类 DNA 片段的表达。因此，表达载体是指重组的 DNA 或 RNA 构建物，诸如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，其一旦被导入合适的宿主细胞后，可以使克隆的 DNA 被表达。合适的表达载体对本领域技术人员来说是公知的，包括那些在原核细胞和 / 或真核细胞中可复制的载体，和那些保持为附加体的载体或那些整合入宿主细胞基因组的载体。

[0155] 如本文中所使用的，蛋白质结合序列是指这样的蛋白质或肽序列，其能够特异性结合到其他蛋白质或肽序列，一般地，是结合到一组蛋白质或肽序列，或结合到特定的蛋白质或肽序列。

[0156] 如本文中所使用的，表位标记 (epitope tag) 是指对应于表位的短的氨基酸残基链，它们有利于随后对具有该表位标记的蛋白质或肽进行生化和免疫学分析。通过将表位标记序列包括入合适表达载体中的蛋白质编码序列，可以完成对表位的标记。表位标记的蛋白质可以用高特异性的抗体进行亲合纯化，所述抗体是用该标记培育获得。

[0157] 如本文中所使用的，金属结合序列是指这样的蛋白质或肽序列，其能够特异性结合到金属离子，通常是一组金属离子，或结合到特定的金属离子。

[0158] 如本文中所使用的，组合或联合 (combination) 指两个或更多个元素之间的任何结合。

[0159] 如本文中所使用的，组合物指任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉、糊，含水的、不含水的或其任何组合。

[0160] 如本文中所使用的，流体指可以流动的任何组合物。因此流体包括半固体、膏、溶液、水混合物、胶、洗液、乳液形式的组合物，和任何其他这样的组合物。

[0161] 如本文中所使用的，细胞的提取物指由裂解的或破裂的细胞制得的制剂或组分。

[0162] 如本文中所使用的，当试剂是被随意选择而未考虑涉及单独蛋白质或蛋白质

同与之联系的底物、结合伴侣(binding partners)等的结合的特异性序列时,该试剂被认为是随意选择的。随意选择的试剂的例子是使用化学文库或肽组合文库(peptide combinatorial library),或生物体的培养液或条件培养基。

[0163] 如本文中所使用的,当试剂是在非随机的基础上被选择并考虑到了目标位点的序列和/或它的与试剂的作用相关的构象时,该试剂被认为是理性选择的或设计的。如描述于实施例中的,在具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4的糖蛋白中,提出了透明质酸酶结合位点和(催化)位点。通过利用构成这些位点的肽序列,可以被理性地选择或理性地设计出试剂。例如,理性选择的肽试剂可以是其氨基酸序列与ATP或钙调蛋白结合位点或结构域相同的肽。

[0164] 寡糖被认为具有还原端和非还原端,无论在还原端的糖是否实际上是还原糖。根据公认的命名法,本文在描述寡糖时将非还原端置于左边,将还原端置于右边。本文在描述所有的寡糖时,使用了非还原糖的名字或缩写(例如Gal),然后是糖苷键的构型(α或β)、环键(ring bond)、在该键中涉及的还原糖的环位置,然后是还原糖的名字或缩写(例如GlcNAc)。两个糖之间的连接可以表示为例如2,3、2.fw darw.3或(2,3)。每个糖均为吡喃糖。

[0165] 如本文中所使用的,N-连接糖部分(N-linked sugar moiety)是指通过Asn残基的酰胺氮附着到sHASEGP的寡糖。N-连接寡糖分为几个主要的类型(甘露寡糖、复合体、杂合物、硫酸化),它们全都通过Asn残基的酰胺氮附着有(Man)3-GlcNAc-GlcNAc-核心,所述Asn残基落入-Asn-Xaa-Thr/Ser-序列中(其中,Xaa不是Pro)。在测序期间,N-连接位点常常可由“空白(blank)”循环的出现而间接指示出来。可以在由PNGase F释放寡糖之后,进行阳性鉴定,PNGase F将糖基化Asn转变为Asp。PNGase F进行释放之后,N-连接的寡糖可以用Bio-Gel P-6层析进行纯化,对寡糖收集物进行制备型高pH阴离子交换层析(HPAEC)(Townsend etal.,(1989)Anal.Biochem.182,1-8)。某些寡糖异构体可以用HPAEC分离。在HPAEC层析谱中海藻糖残基将较早地变换洗脱位置,而其他唾液酸残基将会增加滞留时间。其寡糖结构已知的糖蛋白(例如牛胎球蛋白、α-1酸性糖蛋白、卵白蛋白、RNAseB、转铁蛋白)被同时进行处理,这将方便寡糖峰的指认。收集到的寡糖可以用成分分析和甲基化连接分析的组合方法进行表征(Waegheet al.,(1983)CarbohydrRes.123,281-304.),利用NMR光谱术来测定端基异构构造(anomericconfigurations)(Van Halbeek(1993)in Methods Enzymol 230)。

[0166] 可选择地,寡糖可以用荧光辅助碳水化合物电泳(FACE)进行鉴定。Callewaert et al.(2001)Glycobiology 11,275-281。

[0167] 如本文中所使用的,术语“唾液酸”指九碳羧基化糖(carboxylated sugars)家族的任何成员。唾液酸家族最常见的成员是N-乙酰神经氨酸(2-酮-5-乙酰胺-3,5-二脱氧-D-甘油基-D-galactononulopyranos-1-onic acid(常常缩写为Neu5Ac、NeuAc或NANA)。该家族的另一个成员是N-羟乙酰-神经氨酸(Neu5Gc或NeuGc),其中,NeuAc的N-乙酰基团被羟基化。唾液酸家族的第三个成员是2-酮-3-脱氧-nonulosonic acid(KDN)(Nadano et al.(1986)J.Biol.Chem.261:11550-11557;Kanamori et al.(1990)J.Biol.Chem.265:21811-21819。该家族也包括9-取代的唾液酸,诸如9-O-C.sub.1-C.sub.6酰基-Neu5Ac,如9-O-乳酰-Neu5Ac或9-O-乙酰-Neu5Ac、9-脱氧-9-氟-Neu5Ac和9-叠氮

基-9-脱氧-Neu5Ac。对于唾液酸家族的综述，参见 Varki(1992)Glycobiology 2:25-40；Sialic Acids:Chemistry, Metabolism andFunction, R.Schauer, Ed.(Springer-Verlag, N.Y.(1992))。唾液酸化合物在唾液酸化程序中的合成和应用公开于 1992 年 10 月 1 日公开的国际申请 WO 92/16640 中。

[0168] 如本文中所使用的，PNGase 是指天冬酰氨肽特异性 N-糖苷酶 F，诸如黄杆菌 maningoseptum 肽-N-糖苷酶 F。PNGASE 酶的特征为对 N-连接寡糖而不对 O-连接寡糖具有特异性。PNGASE 效率的表征可以用 SDS PAGE 电泳或荧光辅助碳水化合物电泳来限定。

[0169] 如本文中所使用的，基本上末端化的唾液酸化作用(substantially terminatedsialation)是指用唾液酸残基作为末端糖进行末端化处理的 N-连接寡糖。末端唾液酸可以通过用神经氨酸苷酶处理之后对释放的碳水化合物进行 FACE 分析来鉴定。

[0170] 糖蛋白在血液中的循环寿命(circulatory lifetime)很大程度取决于它的 N-连接碳水化合物基团的组成和结构。该事实与打算经肠胃给药的治疗性糖蛋白直接相关。一般来说，糖蛋白的最大循环半衰期要求它的 N-连接碳水化合物基团以序列 NeuAc-Gal-GlcNAc 终止。如果没有末端唾液酸(NeuAc)，糖蛋白通过涉及潜在的 N-乙酰半乳糖胺(GaINAc)或半乳糖(Gal)残基的识别的机制，迅速从血液中清除掉(Goochee et al.(1991)Biol/Technology 9:1347-1355)。由于该原因，确保在治疗性糖蛋白的 N-连接碳水化合物基团上存在末端唾液酸，对于它们的商业开发是重要的考虑因素。

[0171] 循环中的糖蛋白被暴露于能去除末端唾液酸残基的唾液酸酶（或神经氨酸苷酶）。通常，唾液酸的去除暴露半乳糖残基，这些残基被肝细胞中的半乳糖特异性受体识别并结合（综述于 Ashwell and Harford(1982)Ann.Rev.Biochem.51:531)。肝脏也含有其他的糖特异性受体，其介导糖蛋白从循环中的清除。此类受体的特异性也包括 N-乙酰葡糖胺、甘露糖、海藻糖和磷酸甘露糖。通过肝细胞的半乳糖受体而被清除的糖蛋白经历实质性的降解作用，然后进入胆汁；通过 Kupffer 细胞的甘露糖受体而被清除的糖蛋白进入网状内皮系统（综述于 Ashwelland Harford(1982)Ann.Rev.Biochem.51:53)。

[0172] 如本文中所使用的，中性活性是指在 pH 5 和 8 之间，在盐小于 150mM 和缓冲强度小于 50mM 的条件下，sHASEGP 糖蛋白在体外对糖胺聚糖底物具有催化活性。

[0173] 如本文中所使用的，稳定的溶液是指在室温保存 30 天之后，保留大于 60％的最初活性的 sHASEGP。

[0174] 如本文中所使用的，除非另外特别指出，单位用浊度降低单位(turbidityreducing units, TRU)来表示。一个 TRU 被定义为降低透明质酸的酸化溶液的浊度所需要的透明质酸酶活性的量，并等同于 U.S.P./National Formulary(NF XIII) units(NFU)。本文中描述的 ELISA 样酶分析可以通过经 U.S.P. 标准化的透明质酸酶样品（例如 USP 或 WHO 标准）的标准曲线而与 TRU、NFU 和 U.S.P. 单位相关联。因此，用 ELISA 样酶分析测定的酶活性实际上是相对 TRU，因为酶活性不是用浊度计分析实际测量得到的(Dorfman et al.,1948, J.Biol.Chem.172:367)。

[0175] 如本文中所使用的，效价(potency)是用在体外降解底物所需要的 sHASEGP 蛋白的量来定义的，其基于浊度降低单位或相对浊度降低单位(Relative TurbidityReducing Unit)。

[0176] 如本文中所使用的，比活性是指每毫克蛋白质的活性的单位数。sHASEGP 蛋白的量

定义为在 280nm 处 sHASEGP 溶液的吸光度，假定摩尔消光系数为近似 1.7，单位为 $M^{-1}cm^{-1}$。

[0177] 聚乙二醇 (PEG) 已经被广泛用于生物材料、生物技术和医学中，主要是因为 PEG 是生物可相容的、无毒的、无免疫原性的和水溶性的聚合物 (Zhao and Harris，ACS Symposium Series 680 :458-72，1997)。在药物传送领域，PEG 衍生物已经被广泛用于共价附着到蛋白质 (即 " 聚乙二醇化作用 ")，以减少免疫原性、蛋白水解和肾清除，并增强溶解性 (Zalipsky，Adv. Drug Del. Rev. 16 :157-82，1995)。类似地，PEG 已经被附着到低分子量的、相对疏水的药物上，以增加溶解性、减少毒性和改变生物分布 (biodistribution)。通常，PEG 化的药物作为溶液被注射。

[0178] 紧密相关的应用是合成交联的可降解的 PEG 网络或制剂以用于药物传送，用于设计可降解的可溶性药物载体的化学的许多方面也可以用于设计可降解的凝胶 (Sawhney et al.，Macromolecules 26 :581-87，1993)。还知道，大分子间的复合体可以通过混合两种互补的聚合物的溶液而形成。此类复合体一般通过所涉及的聚合物之间的静电相互作用 (聚阴离子 - 聚阳离子) 和 / 或氢键 (聚酸 - 聚碱)，和 / 或通过在水环境中聚合物之间的疏水相互作用而得以稳定 (Krupers et al.，Eur. Polym J. 32 :785-790，1996)。例如，聚丙烯酸 (PAAc) 和聚氧乙烯 (PEO) 的混合溶液在合适的条件下，主要基于氢键而形成复合体。这些复合体在生理条件的解离作用已经被用于传送游离的 (即，非 PEG 化的) 药物。此外，互补聚合物的复合体已经由均聚物和共聚物形成。

[0179] 在一个方面，聚乙二醇的分子量在约 3kD 至约 50kD 范围内，优选约 5kD 至约 30kD 范围内。通过已知的化学合成技术可将 PEG 共价附着到药物 (称为“PEG 化”或“聚乙二醇化”)。例如，在本发明的一个方面，蛋白质的 PEG 化可以通过在合适的反应条件下，通过将 NHS 活化的 PEG 与蛋白质反应而实现。

[0180] 尽管已经描述了无数的关于 PEG 化作用的反应，那些最经常使用的反应是赋予了方向性、使用温和的反应条件、并且不需要大量的下游工艺来去除毒性催化剂或副产物的反应。例如，单甲氧 PEG(mPEG) 只有一个活性末端羟基，因此它的使用一定程度地限制了所得到的 PEG- 蛋白产物混合物的异质性。与末端甲氧基基团相反的聚合物末端的羟基的激活通常是获得有效的蛋白质 PEG 化作用所必需的，目的是使得衍生的 PEG 更容易遭受亲核攻击。攻击性的亲核试剂通常是赖氨酰残基的 ε - 氨基基团，但是其他的胺也可以反应 (例如组氨酸的 N- 末端 α - 胺或环胺)，如果局部条件是有利的话。在含有单个赖氨酸或半胱氨酸的蛋白质中可能发生更为定向的附着。后一残基可以被 PEG- 马来酰亚胺作为目标，用于硫醇特异性的修饰。可选择地，PEG 酰肼可以与高碘酸盐氧化的 sHASEGP 反应，并在 $NaCNBH_3$ 存在的条件下被还原。更特别地，PEG 化的 CMP 糖可以与 sHASEGP 在合适的糖基转移酶存在的条件下发生反应。一种技术是“聚乙二醇化作用”技术，其中，许多聚合物分子被偶联到被研究的多肽上。当使用该技术时，免疫系统难以识别形成抗体所需的多肽表面上的表位，从而减少免疫应答。对直接引入人体循环系统以给予特定的生理效应的多肽 (即药品)，典型的潜在免疫应答是 IgG 和 / 或 IgM 应答，而通过呼吸系统吸入的多肽 (即工业多肽) 潜在地可以引起 IgE 应答 (即过敏应答)。解释减少的免疫应答的理论之一是聚合物分子掩蔽了多肽表面上的表位，而正是这些表位对导致抗体形成的免疫应答负有责任。另一理论或至少部分因素是共轭物越重，所能获得的免疫应答的减少程度越大。

[0181] 偶联到多肽的聚合物分子可以是任何合适的聚合物分子，具有依据本发明所限定

的分子量，包括天然的和合成的均聚物，诸如多元醇（即聚 -OH）、聚胺（即聚 $-NH_2$）和聚羧酸（即聚 -COOH），以及进一步地，杂聚物，即包括一个或多个不同的偶联基团如羟基基团或胺基团的聚合物。

[0182] 合适的聚合物分子的例子包括选自下列的聚合物分子：聚环氧烷烃 (PAO)，诸如聚亚烷基二醇 (PAG)，包括聚乙二醇 (PEG)、甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 和聚丙二醇、PEG- 缩水甘油醚 (Epox-PEG)、PEG- 氧羰基咪唑 (CDI-PEG) 支链聚乙二醇 (PEGs)、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚 -D，L- 氨基酸、聚乙烯顺丁烯二酸酸酐共聚物、聚苯乙烯苹果酸酸酐共聚物、葡聚糖包括羧甲基 - 葡聚糖、肝素、同源白蛋白、纤维素，包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羧乙基纤维素和羟丙基纤维素，壳聚糖的水解物，淀粉诸如羟乙基 - 淀粉和羟丙基 - 淀粉、糖原、琼脂糖和其衍生物，瓜尔豆胶、短醒霉多糖、菊糖、黄原胶、卡拉胶、果胶、海藻酸水解产物和生物多聚物。

[0183] 优选的聚合物分子是无毒性的聚合物分子，诸如 (m) 聚乙二醇 (mPEG)，进一步地，它们需要相对简单的化学过程便能够共价偶联到酶表面上的附着基团。

[0184] 常见的聚环氧烷烃 (PAO)，诸如聚环氧乙烷，例如 PEG，特别是 mPEG，是优选的聚合物分子，这是因为这些聚合物分子相比起多糖例如葡聚糖、短醒霉多糖和类似物，具有更少的能够发生交联的活性基团，而交联是不利的。

B. sHASEGP 的组织表达情况

[0185] 尽管先前认为 sHASEGP 是睾丸特异性的，但当使用更灵敏的技术如 RT-PCR 时，发现人 sHASEGP 表达在人的多种组织中。sHASEGP 转录物被发现于髓质（脑）、微血管内皮、前列腺、胸、视网膜、收集的人黑素细胞、胎儿心脏和怀孕子宫中。sHASEGP 也表达在生殖细胞肿瘤中。sHASEGP 转录物的 RT-PCR 检测通常是检测在除睾丸之外的组织中的水平所必需的。

C. sHASEGP 酶活性的分析

[0186] 透明质酸酶活性的浊度法微量滴定测定

[0187] 透明质酸酶活性可以通过修饰的浊度法分析在酸化的血清溶液中进行检测。所需要的试剂如下：

用作灌洗的 UV 灭菌的 2× 去离子水或无菌水	Braun	R5000-01
Hylumed Medical- 透明质酸钠，高分子量 HA	Genzyme Advanced Biomaterials	4876
透明质酸酶参考标准	USP	31200
乙酸钾，粒状，USP，ACS	JTBaker	2914-01
冰醋酸，99+%	Sigma	A-6283
一水合磷酸二氢钠，USP，粒状	Mallinkrodt	7774

无水磷酸氢钠,USP	Mallinkrodt	7771

氯化钠,晶体,GR,ACS	EMScience	SX0420-5
明胶水解产物,酶促形成	Sigma	G-0262
马血清,供体群,受测的细胞培养物,受测的杂交瘤培养物,美国来源	Sigma	H-1270
人血清白蛋白 20%	Griffols	
盐酸,ACS 试剂	Sima	H-7020
氯化钙,二水合物,粒状,USP,-FCC	JTBaker	1336-01

[0188] 制备下述试剂:醋酸缓冲溶液-将 14.0g 的乙酸钾和 25.0mL 的冰乙酸加入水中制得 1000mL 溶液。磷酸缓冲溶液-将 2.5g 的磷酸二氢钠、1.0g 的无水磷酸氢钠和 8.2g 的氯化钠加入水中制得 1000mL 溶液。酶稀释贮存液-500mL 的磷酸缓冲溶液加 500mL 的水。酶稀释工作液-将 33mg 的水解明胶加入到 50mL 的酶稀释贮存液中——制备后 2 小时内使用。样品稳定缓冲溶液(" SSB" Soln.)-将 125μL 的 20%人血清白蛋白溶液和 50μL 的 1M 氯化钙溶液加入到 50mL 的酶稀释工作液中,充分混合。血清贮存液-用 9 体积的醋酸缓冲溶液稀释 1 体积的马血清。用 4N 盐酸将 pH 值调到 3.1,并使溶液在室温保持 18 至 24 小时。将溶液保存在 4℃,并在 30 天内使用。血清工作液-将 10mL 的血清贮存液加入到 30L 的醋酸缓冲溶液中,调节到室温。透明质酸贮存液-将透明质酸钠配制为浓度为 5.0mg/mL 的水溶液。透明质酸工作液-将 0.75mL 的透明质酸贮存液加入到 4.25mL 的磷酸缓冲溶液。标准贮存液-在一个容器中制备浓度为 1000 单位/mL 的 USP 参考标准的透明质酸酶的水溶液,分为 50μL 的小份,保存在-20℃。标准工作液-将 40μL 的标准贮存液加入到 960μL 的冷酶稀释工作液,获得已知浓度为 40 单位/mL 的溶液,制备后立即用于测定。

[0189] 依据下述指导,将所有的酶样品稀释于"低蛋白结合(Low Protein Binding)"96-孔板中。

[0190] a)该测定的最大的灵敏度的范围在 10-30 单位/mL 之间。为了获得在该范围内的结果,测定需要反复进行,为了使次数最小化,首先确定样品的总单位数/mL 的近似值,然后选择稀释倍数(整数),以便最终浓度为大约 20 单位/ml。

[0191] b)为了实施测定所需要的最小的样品体积描述如下:FPLC 级分=50μL,组织培养物上清液=1mL,纯化的/浓缩的/最终步骤的材料=10μL。

[0192] c)对于连续稀释的样品,通过将 360μL 的"SSB"溶液和 40μL 的样品吸到各个孔中,在"低蛋白结合"96-孔板上进行 1:10 的稀释,一式三份。

[0193] 为了制备 USP 标准,按如下所述利用"低蛋白结合"96-孔板制备 USP 标准曲线:USP 标准曲线:酶 标准 最终 稀释 工作 浓度孔 标准溶液(μL): 溶液(μL): (单位/mL):A1-A3 St01 0 100 40B1-

B3	St02	20	80	32C1-
C3	St03	40	60	24D1-
D3	St04	60	40	16E1-
E3	St05	80	20	8F1-
F3	St06	90	10	4G1-
G3	St07	100	0	0

[0194] 为了制备 1-3 栏的透明质酸对照，按下述方法在“平底”96- 孔板中制备 H.A. 对照：

[0195]

H.A. 对照：	透明质酸	酶稀释孔：	对照：	工作溶液（μL）：
工作溶液（μL）：				
H1-H3	Co01	0		60

[0196] 反应板 (Reaction Plate)：以每孔 30μL 的量，使用 50μL 8- 通道转移移液管，将透明质酸工作液吸放到“平底”96- 孔微量滴定板，让孔 H1-H3 空着。以 60μL/ 孔的量，将酶稀释工作液吸放到同样的板的孔 H1-H3 中，作为 HA 对照。

[0197] 血清工作液：将 40mL 的血清工作液分配入转移盘 (transfer basin)，并靠近热块 (Heat Block)。

[0198] 预热阶段：一旦两种板制备完成之后，将含有稀释样品、标准样、对照样的低蛋白结合 96- 孔板，和含有透明质酸工作液的平底 96- 孔板置于热块上，将它们在 37℃温热 5 分钟。

[0199] 通过将酶加入到底物来起始反应：使用 5-50μL 8- 通道移液管将来自酶板的 30μL 加入到 96- 孔平底板（含底物）的 #1 栏中的所有孔中。在第一个 15 秒中，将酶 / 底物反应混合物吹吸 5 次（用移液器上下吹吸溶液），以确保样品完全混合。将酶和底物混合之后，驱除掉吸头，将一组新的吸头装载于转移移液管上以用于下一栏的操作。重新启动计时器，在时间 (t) = 0:30 时，对栏 2 重复该过程。在下一 30 秒间隔 (t) = 1:00 时，对栏 3 重复该过程。该过程从左到右横跨整个板重复进行，每 30 秒进行一次，直到所有的孔含有酶和底物。

[0200] 终止反应：当时间达到 6 分钟 (t) = 6:00 时，使用 50-300μL 8- 通道转移移液管，将 240μL 的血清工作液吸放到每一个孔，由临近的 50mL 试剂容器吸放到 96- 孔平底板的栏 1 中。在第一个 10 秒中，混合物被吹吸 3 次（用移液器上下吹吸溶液），以确保完全混合。该过程每 30 秒重复进行，从栏 1 进行到栏 12。一旦完成最后一栏（栏 12），将反应板从热块上移去，并将板置于平板读数器的阅数盘上，640nM。由标准曲线产生线性曲线拟合，由此可以对受测样品进行推断。

[0201] 透明质酸酶的其他可供选择的分析方法

[0202] 生物素化透明质酸微量滴定分析

[0203] 使用生物素 - 酰肼 (Pierce)、硫代 NHS(Pierce) 和 1- 乙基二甲氨基丙基 - 碳二亚胺 (Sigma)，使透明质酸的葡糖醛酸残基上游离的羧基在一步反应中被生物素化。该生物素化的 HA 底物在第二个反应中，被共价偶联到 96 孔微滴定板上。酶反应完成时，残留的底物用抗生物素蛋白 - 过氧化物酶反应进行检测，其可以用标准的 ELISA 平板读数器读出。因为底物是被共价结合于微滴定板，所以矫作结果 (artifact) 例如生物素化底物的 pH 依赖性的置换没有发生。灵敏度使得能够对来自培养细胞和生物样品的透明质酸酶活性进行快

速测定，分析之间的偏差小于 10％。

[0204] 透明质酸酶的比活性用浊度降低单位(turbidity reducing units,TRU)来表示。一个 TRU 被定义为降低透明质酸的酸化溶液的浊度所需要的透明质酸酶活性的量，并等同于 U.S.R./National Formulary(NF XIII)units(NFU)。用于纯化的 ELISA 样酶分析可以通过经 U.S.P. 标准化的透明质酸酶样品（例如 USP）的标准曲线而与 TRU、NFU 和 U.S.P. 单位相关联。因此，用 ELISA 样酶分析测定的酶活性实际上是相对 TRU，因为酶活性不是用浊度计分析实际测量得到的 (Dorfman et al.，1948，J.Biol.Chem.172：367)。

[0205] 许多透明质酸酶分析是基于测量新的还原性 N-乙酰氨基基团的产生 (Bonner and Cantey，Clin.Chim.Acta 13：746-752，1966)，或粘性的损失 (De Saleguiet al.，Arch.Biochem.Biophys 121：548-554，1967) 或浊度 (Dorfman and Ott，J.Biol.Chem.172：367，1948)。采用纯化的底物，所有这些方法足以测定内切葡萄糖胺 (endoglucosamidic) 活性的存在或不存在。

[0206] 基本上纯的糖胺聚糖底物也可以被用于凝胶迁移分析 (Gel Shift Assay)。将糖胺聚糖与重组 sHASEGP 混合，以测试内切葡糖苷酶活性，所述的内切葡糖苷酶活性导致底物在凝胶中的迁移率发生变化。硫酸软骨素 -4 和 6、硫酸皮肤素、硫酸类肝素可以从 Sigma Chemical 获得。人脐带透明质酸可以从 ICN 获得。将每一受测底物用 pH 3.5-7.5 范围内的缓冲液稀释到 0.1mg/ml。10μL 纯化的 sHASEGP 样品或来自表达 sHASEGP 的细胞的条件培养基与 90μl 的受测底物在理想的缓冲液中混合，并在 37℃温育 3 小时。温育之后，样品用样品缓冲液 (Tris EDTApH 8.0、溴酚蓝和甘油）中和，然后进行电泳。通过在含有 0.5％阿尔新蓝的 3％冰乙酸中将凝胶染色过夜，然后在 7％冰乙酸中脱色，来检测糖胺聚糖。通过比较存在或不存在酶的情况下的底物迁移率，对降解结果进行测定。

[0207] 透明质酸酶活性也可以用底物凝胶酶谱法 (substrate gel zymography) 进行检测 (Guentenhoner et al.，1992，Matrix 388-396)。在这种测定中，将样品应用于含有透明质酸的 SDS-PAGE 凝胶，然后通过电泳分离样品中的蛋白。然后将该凝胶在酶分析缓冲液中温育，随后进行染色，以检测凝胶中的透明质酸。通过底物凝胶中的透明带 (cleared zone)，可以看出透明质酸酶活性。

[0208] D. sHASEGP 多肽基因的鉴定和分离

[0209] sHASEGP 多肽基因和/或其结构域可以通过利用本领域已知的 DNA 分离方法获得。任何本领域技术人员所知道的用于鉴定编码期望基因的核酸的方法都可以被使用。本领域可以利用的任何方法都可以用来获得编码 sHASEGP 多肽的全长（即包括整个编码区）cDNA 或基因组 DNA 克隆。例如，聚合酶链反应 (PCR) 可以用来从基因组或 cDNA 文库中扩增在正常组织中表达的序列，例如编码 sHASEGP 多肽的核酸 (SEQ.No：1 和 2)。与在鉴定的序列的 3′ 和 5′ 末端的序列杂交的寡核苷酸引物可以被用作引物，以便通过 PCR 扩增来自合适的来源（例如睾丸、前列腺、乳腺）的核酸样品 (RNA 或 DNA，一般是 cDNA 文库）的序列。

[0210] PCR 可以例如通过使用 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪和 Taq 聚合酶 (GeneAmp) 来进行。被扩增的核酸可以包括来自真核物种的 mRNA 或 cDNA 或基因组 DNA。可以选择合成若干不同的简并引物，以用于 PCR 反应。

[0211] 也可以改变用于引发 PCR 反应的杂交条件的严紧度，以便扩增核酸同源物（例如，为了从除人之外的物种获得 sHASEGP 多肽序列，或为了获得与 sHASEGP 肽同源的人序列），

这通过允许在已知的核苷酸序列和正在被分离的核酸同源物之间存在或大或小的核苷酸序列相似性来进行。对于种间交叉杂交(cross-specieshybridization),可以使用低至中等严紧度的条件。对相同物种的杂交,可以使用中等严紧至高度严紧的条件。这些条件可以经验性确定。

[0212] 在含有整体的或部分的被鉴定的 sHASEGP 多肽序列的核酸,或编码整体的或部分的 sHASEGP 多肽同源物的核酸,被成功扩增之后,该片段可以进行分子克隆和测序,并可用作探针来分离全 cDNA 或基因组克隆。这又使得能够测定该基因的全核苷酸序列、分析它的表达,和生产它的蛋白质产物以用于功能分析。一旦核苷酸序列被确定,编码 sHASEGP 多肽基因蛋白质产物的开放阅读框,可以用本领域已知的用于确定开放阅读框的任何方法来确定,例如,使用用于核苷酸序列分析的共用计算机程序来确定开放阅读框。一旦开放阅读框被定义之后,确定由该开放阅读框编码的蛋白质的氨基酸序列便是常规的了。这样,整个 sHASEGP 多肽基因的核苷酸序列以及 sHASEGP 多肽蛋白质的氨基酸序列和类似物得以确定。

[0213] 任何真核细胞都可能作为用于 sHASEGP 多肽基因的分子克隆的核酸来源。核酸可以从脊椎动物、哺乳动物、人、猪、牛、猫、鸟、马、犬以及其他灵长类、昆虫、植物和其他生物体分离得到。DNA 可以通过本领域已知的标准程序从克隆的 DNA(例如 DNA“文库”)获得、由化学合成获得、由 cDNA 克隆获得,或通过对从期望的细胞纯化获得的基因组 DNA 或其片段进行克隆而获得(参见如 Sambrooket al.1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2d Ed.,Cold Spring HarborLaboratory Press,Cold Spring Harbor,New York;Glover,D.M.Ed.,1985,DNACloning:A Practical Approach,MRL Press,Ltd.,Oxford,U.K.Vol.1,11)。从基因组 DNA 获得的克隆除了编码区域之外,可以含有调控和内含子 DNA 区域;从 cDNA 获得的克隆将只含有外显子序列。对于任何来源,将该基因克隆入合适的载体,以对其进行增殖。

[0214] 对来自基因组 DNA 的基因进行分子克隆,产生 DNA 片段,其中的一些将编码想要的基因。

[0215] 使用各种限制性酶,可以将 DNA 在特定位点切割。

[0216] 可选择地,可以使用 DNAse 在锰存在的条件下切碎 DNA,或者可以用物理的方法剪切 DNA,例如利用超声波法。线性 DNA 片段然后可以依据大小用标准的技术进行分离,包括但不限于琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳和柱层析。

[0217] 一旦 DNA 片段被产生,对含有想要的基因的特定 DNA 片段的鉴定可以用许多方法来完成。

[0218] 例如,(任何物种的)sHASEGP 多肽基因的一部分(例如按上面描述的方法获得的 PCR 扩增产物,或具有已知核苷酸序列的一部分序列的寡核苷酸)或它的特定 RNA,或其片段可以被纯化和标记,所产生的 DNA 片段可以通过将核酸与标记的探针杂交而进行筛选(Benton and Davis,Science 196:180(1977);Grunstein andHogness,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.72:3961(1975))。那些与该探针基本上同源的 DNA 片段将发生杂交。也能够通过下述方法鉴定正确的片段:进行限制性酶消化,并将依据已知的限制性图谱(如果有的话)的那些期望片段与消化片段大小相比较来鉴定正确的片段;或进行 DNA 序列分析,并与 sHASEGP 多肽的已知核苷酸序列进行比较来鉴定正确的片段。依据该基因的特性还可以

作进一步的筛选。可选择地，可以基于它的表达产物的物理、化学或免疫学特性的分析，来检测该基因的存在与否。例如，杂交－选择正确的 mRNA 的 cDNA 克隆或 DNA 克隆可以被选择，其产生具有类似或相同的电泳迁移行为、等电聚焦行为、蛋白水解消化图谱、抗原特性、透明质酸酶活性的蛋白质。如果抗 sHASEGP 多肽的抗体是可以利用的，可以在 ELISA（酶联免疫吸收测定）类型的程序中，通过标记的抗体与推断合成 sHASEGP 多肽的克隆的杂交来鉴定蛋白质。

[0219] 分离 sHASEGP 多肽基因组 DNA 的可供选择的方法包括，但不限于：利用已知的序列通过化学的方法合成基因序列，或由 cDNA 制备编码 sHASEGP 多肽的 mRNA。

[0220] 例如，用于 sHASEGP 多肽基因的 cDNA 克隆的 RNA 可以从表达该蛋白的细胞中分离得到。然后可以将被鉴定和分离出的核酸插入到合适的克隆载体中。可以使用许多本领域已知的载体－宿主系统。可能的载体包括但不限于质粒或修饰的病毒，但是载体系统必须与所使用的宿主细胞相容。此类载体包括但不限于细菌噬菌体，诸如 λ 衍生物，或质粒，诸如 pBR322 或 pUC 质粒衍生物或 Bluescript 载体 (Stratagene，La Jolla，CA)。例如，通过将 DNA 片段连接入携带有互补粘性末端的克隆载体中，可以将 DNA 片段插入到克隆载体中。

[0221] 如果克隆载体中不存在用于切割该 DNA 的互补限制性位点，DNA 分子的末端可以进行酶法修饰。可选择地，通过将核苷酸序列（连接子）连接到 DNA 末端，可以产生任何想要的位点，这些被连接的连接子可以包括特定的化学合成的寡核苷酸，其编码限制性核酸内切酶识别序列。在另一方法中，切割的载体和 sHASEGP 多肽基因可以用均聚物加尾 (homopolymeric tailing) 的方式进行修饰。

[0222] 重组分子可以通过转化、转染、感染、电穿孔、钙沉淀和其他方法被导入宿主细胞中，这样，产生许多拷贝的基因序列。

[0223] 在具体的实施方案中，用整合有分离的 sHASEGP 多肽基因、cDNA 或合成的 DNA 序列的重组 DNA 分子转化宿主细胞，能产生多拷贝的基因。

[0224] 因此，基因可以通过下述方法大量获得：培养转化子，从转化子中分离重组 DNA 分子，并且必要时，从分离的重组 DNA 中回收感兴趣的基因。

[0225] E. 含有编码 SHASEGP 多肽或其透明质酸酶结构域的核酸的载体、质粒和细胞，以及 SHASEGP 多肽载体和细胞的表达

[0226] 为了重组表达一个或多个 sHASEGP 多肽，含有编码 sHASEGP 多肽的核苷酸序列的所有序列或部分序列的核酸可以被插入到合适的表达载体中，所述的表达载体含有用于转录或翻译插入的蛋白质编码序列的必要元件。必要的转录和翻译信号也可以由 sHASEGP 基因的天然启动子和／或它们的侧翼区域提供。

[0227] 也提供了这样的载体，其含有编码 sHASEGP 的核酸，该核酸可以被导入到能够产生可溶性中性活性 sHASEGP 的表达系统中。

[0228] 也提供了含有载体的细胞。该细胞包括真核或原核细胞，且该载体适合用于那些细胞中。

[0229] 提供了含有所述载体的真核细胞，包括二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 (DG44)。合适的细胞包括酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞和动物细胞。细胞可以被用来生产 sHASEGP 多肽或其透明质酸酶结构域，通过下述方法：(a) 将上述细胞在编码的 sHASEGP 多肽或 sHASEGP 多肽的透明质酸酶结构域被细胞表达的条件下培养，然后 (b) 回收

表达的透明质酸酶结构域蛋白。在示范性的实施方案中，透明质酸酶结构域被分泌入培养基中。

[0230] 在一种实施方案中，提供的载体包括编码多肽的核苷酸序列，其中，该多肽具有透明质酸酶活性并且含有 sHASEGP 蛋白的所有或部分的透明质酸酶结构域或其多份拷贝。也提供了这样的载体，其包括编码透明质酸酶结构域和额外部分的 sHASEGP 蛋白——可长达全长 sHASEGP 蛋白并包括全长 sHASEGP 蛋白质在内——的核苷酸序列，也提供了其多个拷贝。载体可以被选择以便在细胞中表达 sHASEGP 蛋白质或其透明质酸酶结构域，或，sHASEGP 蛋白可以作为分泌蛋白而被表达。可选择地，载体可以包括对于编码蛋白的分泌所必需的信号。当透明质酸酶结构域被表达时，核酸可以被连接到编码分泌信号的核酸上，诸如酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 的接合因子 (mating factor) 信号序列或其部分，或天然的信号序列。

[0231] 为了产生可溶性的中性活性的 sHASEGP，能够引入 N- 连接糖基化作用的细胞是被要求的。在优选的实施方案中，二氢叶酸还原酶缺陷型的哺乳动物中国仓鼠卵巢细胞诸如 DG44，用质粒进行电转，所述质粒编码强哺乳动物启动子诸如 CMV 启动子、sHASEGP 编码核酸以及跟随着的内部核糖体进入位点、小鼠二氢叶酸还原酶基因和 SV40 多聚腺苷酸化序列，如 SEQ ID NO.51 所显示。然后将此类细胞在缺少次黄嘌呤和胸苷的化学成份确知的培养基中培养，然后再随着增加浓度的甲氨蝶呤进行基因扩增。

[0232] 各种宿主 - 载体系统可以被用来表达蛋白质编码序列。这些包括但不限于 ：用病毒（例如牛痘病毒、腺病毒等）感染的哺乳动物细胞系统 ；用病毒（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统 ；微生物诸如含有酵母载体的酵母 ；或用噬菌体、DNA、质粒 DNA 或柯斯 DNA 转化的细菌。载体的表达元件在它们强度和特异性方面有所变化。取决于所使用的宿主 - 载体系统，有大量合适的转录和翻译元件可以选择使用。注意，sHASEGP DNA 在细菌中的表达本身不会产生具有催化活性的 sHASEGP，但是当同时进行合适的糖基化作用时——可以通过人工的方法进行这样的糖基化作用，便能产生催化活性。

[0233] 本领域技术人员所知道的用于将核酸片段插入载体的任何方法都可以被用于构建含有嵌合基因的表达载体，其含有合适的转录 / 翻译控制信号和蛋白质编码序列。这些方法可以包括体外重组 DNA 和合成技术以及体内重组（遗传重组）。编码 sHASEGP 多肽或其结构域、衍生物、片段或同源物的核酸序列的表达可以受到另一核酸序列的调控，以便基因或其片段表达于用重组 DNA 分子转化的宿主中。例如，蛋白质的表达可以受到本领域已知的启动子 / 增强子的控制。在特定的实施方案中，启动子对于 sHASEGP 多肽的基因来说不是天然的。可以被使用的启动子包括但不限于 SV40 早期启动子 (Bernoist and Chambon，Nature 290 ：304-310(1981)、包含在劳斯肉瘤病毒的 3′ 长末端重复序列中的启动子 (Yamamoto et al.，Ce//22 ：787-797(1980)、疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA78 ：1441-1445(1981)、金属硫蛋白基因的调控序列 (Brinster et al.，Nature 296 ：39-42(1982)) ；原核表达载体诸如 β - 内酰胺酶启动子 (Villa-Kamaroff et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 ：3727-37311978)) 或 TAC 启动子 (Deboer et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80 ：21-25(1983)) ；也参见 " Useful Proteins from Recombinant Bacteria" ：inScientific American 242 ：79-94(1980)) ；包含乳白合成酶 (opaline synthetase) 启动子的植物表达载体 (Herrar-Estrella et al.，Nature

303 :209-213(1984)) 或花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子 (Garder et al.,Nucleic Acids RES.9 :2871(1981)),和光合成酶核酮糖二磷酸羧化酶的启动子 (Herrera-Estrella et al.,Nature 310 :115-120(1984)) ;来自酵母和其他真菌的启动子元件诸如 Gal4 启动子、乙醇脱氢酶启动子、磷酸甘油激酶启动子、碱性磷酸酶启动子,和下述的显示出组织特异性并已被应用于转基因动物的动物转录控制区域 :在胰腺腺泡细胞中具有活性的弹性酶 I 基因控制区 (Swift Et Al.,Cell 38 :639-646(1984) ;Ornitz Et Al.,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50 :399-409(1986) ;Macdonald,Hepatology 7 :425-515(1987)) ;在胰腺 β 细胞中具有活性的胰岛素基因控制区域 (Hanahan et AL.,Nature 315 :115-122(1985)),在淋巴细胞中具有活性的免疫球蛋白基因控制区 (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)),在睾丸、胸、淋巴和肥大细胞中具有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区 (Leder etAL.,CELL 45 :485-495(1986)),在肝脏中具有活性的白蛋白基因控制区 (PINCKERT et AL.,Genes and Devel.1 :268-276(1987)),在肝脏中具有活性的 α - 胎蛋白基因控制区 (Krumlauf et AL.,Mol.Cell.Biol.5 :1639-1648(1985) ;Hammer et AL.,Science 235 :53-581987)),在肝脏中具有活性的 α -1 抗胰蛋白酶基因控制区 (Kelseyet al.,Genes And Devel.1 :161-171(1987)),在髓细胞中具有活性的 β 球蛋白基因控制区 (Mogram et al.,Nature 315 :338-340(1985) ;Kollias et AL.,CE//46 :89-94(1986)),在脑的少突细胞中具有活性的髓鞘碱性蛋白基因控制区 (Readhead et al.,Cell 48 :703-712(1987)),在骨骼肌中具有活性的肌球蛋白轻链 -2 基因控制区 (Sani,Nature 314 :283-286(1985)),和在下丘脑的促性腺激素细胞中具有活性的促性腺激素释放激素基因控制区 (Mason et al.,Science 234 :1372-1378(1986))。

[0234] 在特定的实施方案中,使用这样的载体,其含有启动子,其可有效连接到编码 sHASEGP 多肽或其结构域、片段、衍生物或同源物的核酸,还含有一个或多个复制起点,以及任选地,一个或多个选择性标记 (例如抗生素抗性基因)。

[0235] 特异性的起始信号是有效地翻译 sHASEGP 序列所必需的。这些信号包括 ATG 起始密码子和临近的序列。对于 sHASEGP,在它的起始密码子和上游序列被插入到合适的表达载体中的情况下,可以不需要额外的翻译控制信号。然而,在仅仅编码序列或其一部分被插入的情况下,需要提供外源的转录调控信号,包括 ATG 起始密码子。而且,起始密码子必须在正确的阅读框中,以确保整个插入物能够转录。外源的转录元件和起始密码子可以是各种来源的,可以天然的或合成的。通过纳入适合于所使用的细胞系统的增强子,表达的效率可以得到增强 (Scharf D et al(1994)Results Probl Cell Differ 20 :125-62 ;Bittner et al(1987)Methodsin Enzymol 153 :516-544)。

[0236] 此外,可以选择能够调节感兴趣的序列的表达或能以期望的方式对表达的蛋白质进行加工的宿主细胞菌株。对多肽的此类修饰包括但不限于乙酰化作用、羧化作用、糖基化作用、磷酸化作用、脂化作用和酰化作用。对“前原 (prepro)”形式的蛋白质进行切割的翻译后加工,对于正确的插入、折叠和 / 或功能也是重要的。不同的宿主细胞诸如 CHO(DG44、DXB11 CHO-K1)、HeLa、MDCK、293、WI38 等都具有实现这样的翻译后活性的特定细胞器 (cellular machinery) 和特征机制 (characteristic mechanisms),可以对它们加以选择以确保对引入的外来蛋白质进行正确的修饰或加工。

[0237] 为了长期地高产量地产生重组蛋白质，稳定的表达是优选的。例如，稳定表达sHASEGP的细胞系可以用含有病毒复制起点或内源性表达元件和选择性标记基因的表达载体进行转化。引入载体后，细胞可以在富集培养基中培养1-2天，再转移到选择性培养基。选择性标记的目的是赋予抗性以便进行选择，它的存在使得成功地表达被引入的序列的细胞能够生长和被回收。稳定转化的细胞的抗性群落(resistant clumps)可以用适合于该细胞类型的组织培养技术进行繁殖。

[0238] 大量的选择系统可以被用于回收转化的细胞系。这些选择系统包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M et al(1977)Cell 11:223-32)和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy I et al(1980)Cell 22:817-23)基因，它们分别可以被用于TK-或APRT-细胞。另外，抗代谢药、抗生素或除草剂抗性可以被用作选择的基础；例如DHFR，其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler M et al(1980)Proc Natl Acad Sci 77:3567-70)；npt，其赋予对氨基糖苷新霉素和G-418的抗性(Colbere-Garapin F et al(1981)J MolBiol 150:1-14)，和als或pat，其分别赋予对氯磺隆和草铵膦乙酰转移酶的抗性(Murry，supra)。其他的选择性标记基因已经被描述，例如，trpB，其使得细胞可以利用吲哚来替代色氨酸，或hisD，其使得细胞可以利用组氨醇来替代组氨酸(Hartman S C and R C Mulligan(1988)Proc Natl Acad Sci 85:8047-51)。最近，使用可视化的标记已成为流行，这样的标记如花青素、β 葡萄糖醛酸酶和它的底物GUS以及荧光素酶和它的底物虫荧光素，这不但已经被广泛用于鉴定转化子，也被用于对通过特定的载体系统来实现的瞬时或稳定的蛋白表达进行量化(Rhodes C A etal(1995)Methods Mol Biol 55:121-131)。

[0239] 对含有多核苷酸序列的转化子的鉴定

[0240] 尽管标记基因表达的存在/不存在表明了感兴趣的基因的存在与否，但是活性sHASEGP的存在和表达应该被确证。例如，如果sHASEGP被插入到标记基因序列中，含有sHASEGP的重组细胞可以通过标记基因功能的缺失而得以鉴定。可选择地，标记基因可以与sHASEGP序列一前一后地置于同一个启动子的控制之下。标记基因因诱导或选择而发生的表达通常表示与之串连的sHASEGP也被表达。通过在合适的条件下测试条件培养基的sHASEGP酶活性，可以检测被适当糖基化的具有中性活性的sHASEGP。

[0241] SHASEGP的纯化

[0242] 用sHASEGP核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适合于表达被编码的蛋白质和从细胞培养物中对其进行回收的条件下进行培养。由重组细胞产生的蛋白质优选是可分泌的，但可以包含于细胞内，这取决于所使用的序列和/或载体。如本领域技术人员所知道的，包含sHASEGP的表达载体，可以设计为具有信号序列，这有利于sHASEGP通过原核或真核细胞膜直接分泌出来。其他重组构建可以将sHASEGP与编码有助于可溶性蛋白的纯化的多肽结构域的核苷酸序列连接起来(Kroll D J et al(1993)DNA Cell Biol 12:441-53；cf discussion of vectors infracontaining fusion proteins)。

[0243] sHASEGP作为重组蛋白也可以与一个或多个额外的多肽结构域一起表达，添加这些额外的多肽结构域是为了方便蛋白纯化。这样的有助于纯化的结构域包括但不限于金属螯合肽，诸如组氨酸-色氨酸模块，其允许在固定化的金属上进行纯化、蛋白A结构域，其允许在固定化的免疫球蛋白上进行纯化，以及用于FLAGS延伸/亲合纯化系统的结构域(Immunex Corp，Seattle Wash.)。在所述纯化结构域和sHASEGP之间包含入可切割的连接

子序列诸如因子 Xa 或肠激酶 (Invitrogen, SanDiego Calif.),可用于帮助纯化。一个用于表达包含 sHASEGP 的融合蛋白的这样的表达载体被提供,其含有编码六组氨酸残基的核酸,并接有硫氧还蛋白和肠激酶切割位点。所述组氨酸残基有助于在 IMIAC(固定化金属离子亲合层析)上进行纯化,如Porath et al(1992)Protein Expression and Purification 3 :263-281 中所述,而肠激酶切割位点为由融合蛋白纯化趋化因子提供了手段。

[0244] 除了重组产生之外,sHASEGP片段也可以使用固相技术通过直接的肽合成产生(cf Stewart et al(1969)Solid-Phase Peptide Synthesis,W H Freeman Co,SanFrancisco ; Merrifield J(1963)JAm Chem Soc 85 :2149-2154)。使用手工技术或自动化技术,可以进行蛋白质的体外合成。自动化合成例如可以通过使用 AppliedBiosystems 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer,Foster City Calif.),依据制造商提供的说明书来完成。SHASEGP 的不同片段可以分别进行化学合成,然后使用化学的方法组合起来,产生全长的分子。

[0245] 含有 sHASEGP 多肽的编码序列或其部分的表达载体,例如可以通过将所述编码部分亚克隆入 3 个 PGEX 载体中的每一个的 EcoRI 限制性位点而制备得到(谷胱甘肽 S- 转移酶表达载体 (Smith and Johnson, Gene 7 :31-40(1988))。这使得产物可以以正确的阅读框被表达。用于表达 sHASEGP 多肽的透明质酸酶结构域的示范性载体和系统包括公知的毕赤酵母 (Pichia) 载体(例如可从 Invitrogen,San Diego,CA 获得),特别是那些设计用于分泌被编码的蛋白质的载体和系统。蛋白质也可以在细胞质内被表达,诸如以包涵体的形式。一个示范性的载体描述于实施例中。

[0246] 用于转化大肠杆菌的质粒包括例如 pET 表达载体(参见美国专利 4,952,496 ;来自 Novagen, Madison, WI ;也参见 Novagen 出版的文献,其描述了该系统)。

[0247] 这样的质粒包括 pET 11a,其包含 T7lac 启动子、T7 终止子、诱导型大肠杆菌 lac 操纵子和 lac 阻遏物基因 ;pET 12A-C,其含有 T7 启动子、T7 终止子和大肠杆菌 OMPT 分泌信号 ;和 pET 15B 和 pET19B(Novagen, Madison, Wi),其含有便于用 His 柱纯化的 His-Tag 前导序列和便于在柱纯化之后进行切割的凝血酶切割位点 ;T7-lac 启动子区域和 T7 终止子。

[0248] 载体被导入宿主细胞,诸如毕赤酵母细胞和细菌细胞诸如大肠杆菌中,蛋白质表达于其中。示范性的毕赤酵母菌株例如包括 GS115。示范性的细菌宿主含有编码 T7RNA 聚合酶的 DNA 的染色体拷贝,其有效连接到诱导型启动子诸如 LACUV 启动子(参见美国专利 4,952,496)。这样的宿主包括但不限于溶原性大肠杆菌菌株 BL 21(DE3)。

[0249] sHASEGP 结构域、衍生物和类似物可以通过各种本领域已知的方法产生。例如,一旦表达 HASEGP 多肽或其结构域、片段或衍生物的重组细胞被鉴定出之后,单独的基因产物可以被分离和分析。这可以通过基于该蛋白的物理 / 或功能特性的分析来实现,所述分析包括但不限于 :对产物进行放射性标记,然后通过凝胶电泳、免疫测定、与标记物标记的产物进行交联和测定蛋白水解活性来进行分析。

[0250] sHASEGP 多肽可以用本领域已知的标准方法分离和纯化(或者从天然来源或者从表达复合体或蛋白质的重组宿主细胞获得),所述方法包括但不限于柱层析(例如,离子交换、亲合、凝胶排阻、反相高压和快速蛋白液体 (fast protein liquid))、差异离心、差异溶解,或通过用于纯化蛋白质的其它任何标准技术。

[0251] 在一种实施方案中,sHASEGP 可以由 HZ24 转染和甲氨蝶呤扩增的 DG44 细胞的化

学成分确定的条件培养基中纯化至同质，这通过下述方法进行：1) 切向流渗滤，2) 利用阴离子交换层析进行结合并洗脱，3) 流经苯基琼脂糖层析，4) 利用苯基硼酸盐层析进行结合并洗脱，和 4) 利用羟磷灰石层析进行结合并洗脱。

[0252] 可以使用本领域已知的任何合适的分析方法来评价功能特性。

[0253] 可选择地，一旦鉴定出 sHASEGP 多肽或它的结构域或衍生物，该蛋白的氨基酸序列可以从编码它的基因的核苷酸序列推断出来。结果，蛋白或它的结构域或衍生物可以用本领域已知的标准化学方法合成得到（例如参见 Hunkapiller et al，Nature 310：105-111(1984)），再进行体外的糖基化作用。

[0254] 可以在蛋白质水平对 sHASEGP 多肽序列进行操作。本文也考虑这样的 sHASEGP 多肽、其结构域、其衍生物或类似物或片段，即，其在翻译期间或翻译后进行不同的修饰，例如糖基化作用、乙酰基化作用、磷酸化作用、氨基化作用、聚乙二醇化作用、通过已知的保护 / 封阻基团进行的衍生化作用、蛋白质水解切割、连接到抗体分子或其他细胞配体。

[0255] 许多化学修饰中的任何一种都可以用已知技术来实施，包括但不限于用溴化氰、胰蛋白酶、糜蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8、NABH4 进行特异性的化学切割，乙酰基化作用、甲酰基化作用、氧化作用、还原作用、新陈代谢合成，这是在衣霉素和其他这样的试剂存在的情况下进行的。

[0256] 此外，sHASEGP 多肽的结构域、类似物和衍生物可以化学合成。例如，对应于 sHASEGP 多肽的某部分的肽——其包括想要的结构域或者其在体外介导想要的活性——可以使用肽合成仪来合成。

[0257] 而且，如果有必要的话，非基本的氨基酸或化学氨基酸类似物可以被引入，以替代或加入到 sHASEGP 多肽序列。总体上说，非基本的氨基酸包括但不限于常见氨基酸的 D- 异构体、α - 氨基异丁酸、4- 氨基丁酸、Abu、2- 氨基丁酸、E-ABU、e-Ahx、6- 氨基己酸、Aib、2- 氨基异丁酸、3- 氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、半胱磺酸、t- 丁基甘氨酸、t- 丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β - 丙氨酸、氟代氨基酸、特别设计的氨基酸诸如 β - 甲基氨基酸、ca- 甲基氨基酸、na- 甲基氨基酸和氨基酸类似物。此外，氨基酸可以是 d（右旋）或 l（左旋）的。

[0258] 当天然产物被怀疑是突变体或者是分离自新种时，分离自该天然来源的 sHASEGP 多肽的氨基酸序列，以及那些在体外表达的或者在体内或体外由合成的表达载体表达的多肽的氨基酸序列，可以通过对 DNA 序列的分析来确定，或者可选择地，可以通过对分离的蛋白质进行直接测序来确定。这样的分析可以通过人工测序或通过使用自动氨基酸测序仪来实施。

[0259] 修饰 - 本文考虑了许多的 sHASEGP 多肽和结构域的修饰方法。编码 sHASEGP 的核酸分子可以利用本领域已知的许多策略来进行修饰 (Sambrook ETA/.(1990)，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，2d ed.，Cold Spring HarborLaboratory，Cold Spring Harbor，New York)。这些序列可以用限制性内切酶在合适的位点进行切割，然后进行进一步的酶促修饰，如果有必要的话，再分离并进行体外连接。在编码 sHASEGP 的结构域、衍生物或类似物的基因的生产中，应该小心以确保在编码期望活性的基因区域，该被修饰的基因保留原始的翻译阅读框，而不被翻译终止信号阻断。

[0260] 此外，编码 sHASEGP 的核酸分子可以在体外或体内进行突变，以产生和 / 或破坏

翻译、起始和/或终止序列，或者产生编码区域中的变异，和/或形成新的限制性内切酶位点或破坏先前存在的位点，从而方便进一步的体外修饰。而且，如本文中所描述地，也考虑了一级序列发生变化的突变蛋白，例如 Cys 残基的替代和糖基化位点的消除或添加。SEQ ID No.1 中描述的 sHASEGP 具有 7 个潜在的糖基化位点。这样的修饰可以由本领域已知的用于突变发生的任何技术来完成，这些技术包括但不限于化学诱变技术和体外定点诱变技术 (Hutchinson et al., j.Biol.Chem.253:6551-6558(1978))，可以使用 TABE Linkers(Pharmacia)。在一种实施方案中，例如，sHASEGP 多肽或其结构域被修饰以包括进荧光标记。在其它特定的实施方案中，sHASEGP 多肽被修饰以具有异质双功能试剂，这样的异质双功能试剂可以被用于交联复合体中的成员。

[0261] 此外，sHASEGP 的结构域、类似物和衍生物可以用化学的方法合成。例如，对应于 sHASEGP 多肽的某部分的肽——其包括想要的结构域或者其在体外介导想要的活性——可以使用肽合成仪来合成。而且，如果有必要的话，非基本的氨基酸或化学氨基酸类似物可以被引入，以替代或加入到 sHASEGP 序列。总体上说，非基本的氨基酸包括但不限于常见氨基酸的 D- 异构体、α- 氨基异丁酸、4- 氨基丁酸、Abu、2- 氨基丁酸、E-ABU、e-Ahx、6- 氨基己酸、Aib、2- 氨基异丁酸、3- 氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、半胱磺酸、t- 丁基甘氨酸、t- 丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β- 丙氨酸、氟代氨基酸、特别设计的氨基酸诸如 ti- 甲基氨基酸、ca- 甲基氨基酸、na- 甲基氨基酸和氨基酸类似物。此外，氨基酸可以是 d(右旋) 或 1(左旋) 的。

[0262] F. 具有 N- 连接糖部分的功能活性糖基化 SHASEGP 的产生

[0263] 适当地 N- 糖基化的人 sHASEGP 是产生催化性能稳定的蛋白质所必需的。sHASEGP 的 N- 连接糖基化可以通过各种技术来实现。sHASEGP 的糖基化作用可以通过下述方法实现：将编码 sHASEGP 的核酸引入能够进行适当的糖基化的真核细胞，或者，将 sHASEGP 多肽与能够引入期望的 N- 连接糖部分的无细胞提取物或纯化的酶相接触。

表达系统的选择

[0264] 由真核细胞表达系统引入到异位表达的多肽中的糖基化作用的程度和类型会有所变化。例如，CHO 细胞可高效率地将 N- 连接糖基化作用引入到活性 sHASEGP 多肽中。

[0265] 可以引入 N- 连接的糖基化作用以产生功能性 sHASEGP 产物的其他真核表达系统可以通过将人 sHASEGP 表达质粒引入所述细胞中并测试中性活性而得以测试。合适的 N- 连接糖基化作用可以利用 PNGASE 释放的寡糖的 FACE 分析来确定。本文中进一步提供了具有催化活性的 sHASEGP 的糖基化情况。糖基化的确认也可以通过用 PNGASE-F 处理来自所述细胞的 sHASEGP 来进行，或通过在导入编码 sHASEGP 的核酸之后将此细胞培养在衣霉素中来进行。

[0266] sHASEGP 多肽在体外的 N- 糖基化作用。sHASEGP 多肽可以通过下述方法进行 N- 糖基化：将 sHASEGP 多肽与无细胞提取物接触，该无细胞提取物具有将 N- 连接的糖转移到 sHASEGP 多肽的活性，无细胞提取物诸如犬微粒体膜，或者通过偶联的转录和翻译，如通过商业渠道可获得的 (Promega Madison WI)。

[0267] 寡糖被认为具有还原端和非还原端，无论在还原端的糖是否实际上是还原糖。根据公认的命名法，本文在描述寡糖时将非还原端置于左边，将还原端置于右边。本文在描

述所有的寡糖时，使用了非还原糖的名字或缩写（例如 Gal），然后是糖苷键的构型（α 或 β）、环键 (ring bond)、在该键中涉及的还原糖的环位置，然后是还原糖的名字或缩写（例如 GlcNAc）。两个糖之间的连接可以表示为例如 2,3、2.fw darw.3 或 (2,3)。每个糖均为吡喃糖。

[0268] 如本文中所使用的，N- 连接糖部分 (N-linked sugar moiety) 是指通过 Asn 残基的酰胺氮附着到 sHASEGP 的寡糖。N- 连接寡糖分为几个主要的类型（甘露寡糖、复合的、杂合的、硫酸化的），它们所具有的 (Man)3-GlcNAc-GlcNAc- 核心附着于 Asn 残基的酰胺氮，所述 Asn 残基落入 -Asn-Xaa-Thr/Ser- 序列中（其中，Xaa 不是 Pro）。N- 连接位点常常可由在测序期间“空白 (blank)”循环的出现而间接指示出来。可以在由 PNGase F 释放寡糖之后，进行阳性鉴定，PNGase F 将糖基化 Asn 转变为 Asp。PNGase F 进行释放之后，N- 连接的寡糖可以用 Bio-Gel P-6 层析进行纯化，对寡糖收集物进行制备型高 pH 阴离子交换层析 (HPAEC)(Townsend etal.,(1989)Anal.Biochem.182,1-8)。某些寡糖异构体可以用 HPAEC 分离。在 HPAEC 层析谱中海藻糖残基将较早地变换洗脱位置，而其他唾液酸残基将会增加滞留时间。其寡糖结构已知的糖蛋白（例如牛胎球蛋白、α-1 酸性糖蛋白、卵白蛋白、RNAseB、转铁蛋白）被同时进行处理，这将方便寡糖峰的指认。收集到的寡糖可以用成分分析和甲基化连接分析的组合方法进行表征 (Waegheet al.,(1983)CarbohydrRes.123,281-304.)，利用 NMR 光谱术来测定端基异构构造 (anomericconfigurations)(Van Halbeek(1993)in Methods Enzymol 230)。

[0269] 可选择地，寡糖可以用荧光辅助碳水化合物电泳 (FACE) 进行鉴定。Callewaert et al.(2001)Glycobiology 11,275-281。

[0270] G.sHASEGP 上的 N- 连接糖部分的检测和表征

[0271] 确定蛋白是否被糖基化是糖蛋白聚糖分析中首要的步骤。在十二烷基磺酸钠存在的条件下进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 是可选择作为在蛋白质测序之前的最终步骤的方法。糖基化的蛋白质在 SDS-PAGE 中常常以弥散的条带进行迁移。用肽 -N4-(N- 乙酰 -D- 氨基葡萄糖基）天冬酰胺酰胺酶 (PNGase F) 处理之后带宽的显著增加和迁移位置的变化被认为表明发生了 N- 糖基化作用。如果其他类型的糖基化作用是主要的，其他方法必须被使用。凝集素印迹法提供了一种独立于糖基化类型 (N 和 O) 的方法。凝集素，从各种植物组织得到的碳水化合物结合蛋白，对于许多在糖蛋白聚糖上发现的确定的糖表位不但具有高的亲和力且具有窄的特异性 (Cummings,R.D.(1994)Methods in Enzymol.230,66-86.)。当与生物素或地高辛结合时，利用与碱性磷酸酶连接的抗生物素蛋白或抗 - 地高辛抗体，可以容易地通过比色反应在膜印迹上将它们鉴定出 (Haselbeck,et al.(1993)Methods in Mol.Biol.14,161-173.)，这类似于蛋白质印迹中使用的二抗 - 碱性磷酸酶反应。用一组具有清楚限定的特异性的凝集素所进行的筛选可以提供关于糖蛋白的碳水化合物补充物的大量信息。重要的是，颜色显影放大 (color development amplification) 是足够高的，以致 10-50ng 的糖蛋白能容易地在 SDS-PAGE 的膜印迹上看见。尽管凝集素对它们的同系配体显示出很高的特异性，一些人的确非常希望了解结构相关的表位。因此，重要的是，当选择一组凝集素时，应该注意交叉反应性的可能性，并使用那些最有可能将复合的、杂合的和高甘露糖的 N- 连接聚糖与 O- 连接的结构独立地区分开来的凝集素。

[0272] 单糖分析也可以被用来确定 sHASEGP 是否被糖基化，并且在凝集素分析的情况

下，这提供了关于结构特征的额外信息。定量单糖成分分析 i) 鉴定糖基化蛋白，ii) 给出各种糖与蛋白质的摩尔比，iii) 在某些情况下提示寡糖类型的存在，iv) 是设计结构阐明策略 (structural elucidation strategy) 的第一步，和 v) 为用于重组糖蛋白疗法的产品的一致性提供了一种测量手段。近年来，使用脉冲电流检测 (pulsed amperometric detection) 的高 pH 阴离子交换层析 (HPAEC-PAD) 已被广泛用于测定单糖成分 (Townsend, et al.(1995)in Carbohydrate Analysis:High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis(Z.El Rassi ed.).pp.181-209.)。更最近地，基于荧光团的标记方法已被引入，并且许多可以以试剂盒的形式获得。荧光方法的明显优点是灵敏性增加 (50 倍)。一个潜在的不利之处是，在水解产物中或者在外部标准混合物 (external standard mixture) 中，在偶联反应期间，不同的单糖对荧光团可能显示出不同的选择性。然而，灵敏性的增加和由可获得的糖蛋白的总量中的一小部分便能鉴定出存在哪些单糖的能力，以及应用激光诱发荧光所带来的潜在的更大的灵敏性使得该方法具有吸引力。

[0273] 小量的 sHASEGP 的单糖成分分析最好在电印迹——如果待分析的是更少量的等份的话，等份试样最好是被点印迹——之后，再在 PVDF(PSQ) 膜上进行 (Weitzhandleret al, (1993)J.Biol.Chem.268,5121-5130.)。PVDF 是碳水化合物分析的理想基质，这是因为一旦通过酸或酶促水解被释放之后，单糖或寡糖都不能再结合于膜。

[0274] FACE 分析是检测 sHASEGP 的糖基化情况的有效手段。应用了 30％寡糖凝胶的 FACE® N-连接寡糖作图 (Prozyme) 便是一种这样的机制。通过用 N-聚糖酶 (a.k.a PNGase) 进行酶促消化而从 100μg 的糖蛋白上切下的、经荧光团 ANTS 标记并通过电泳分离而得到的寡糖可以用于检测 sHASEGP 的糖基化情况。通过将样品和该样品的稀释物以及寡糖标准梯度标记物一同跑胶，可以确定寡糖条带的相对位置，其中，以聚合度 (DP) 单位来表示迁移距离。

[0275] H. 用于鉴定调节 sHASEGP 活性的化合物的筛选方法

[0276] 本文中例举并描述了若干类分析方法。应该理解的是，透明质酸酶结构域可以用于其他分析方法。然而，这里要说明的是，透明质酸酶结构域显示出催化活性。

[0277] 同样地，它们对于体外的筛选分析也是理想的。

[0278] 它们也可以用于结合分析。

[0279] sHASEGP 全长酶原、活性酶和透明质酸酶结构域都被考虑应用于本领域技术人员已知的筛选分析中，包括本文中所提供的那些分析方法。因此，下面的描述，如果是涉及透明质酸酶分析，则旨在应用包括 sHASEGP 在内的任何透明质酸酶的单链透明质酸酶结构域或其催化活性部分。其他分析例如结合分析也在本文中提供，特别是应用于 sHASEGP，包括任何变体例如其拼接变体。

[0280] 1. 用于鉴定调节 sHASEGP 蛋白的透明质酸酶活性的试剂的催化分析方法。本文提供了用于鉴定 sHASEGP，特别是其单链透明质酸酶结构域或催化活性部分的催化活性的调节物的方法。该描述通过下述步骤实施：将全长酶原或活化形式的 sHASEGP，特别是其单链结构域在受测物质存在的情况下与该 sHASEGP 的底物相接触，检测底物的蛋白水解，由此评估该 sHASEGP 的活性，并将该活性与对照相比较。例如，对照可以是通过下述步骤评估出的 sHASEGP 活性：将包括全长酶原或活化形式在内的 sHASEGP，特别是其单链结构域与该 sHASEGP 的底物相接触，检测底物的蛋白质水解，由此评估出 sHASEGP 的活性。在存在和不

存在所述的受测化合物时的结果被比较。活性的差异指示了受测物质调节 sHASEGP 的活性。sHASEGP 活化切割的激活剂也被考虑到；这样的分析在后面被讨论到。

[0281] 在一种实施方案中，多种受测物质在上述的筛选方法中同时被筛选。在另一实施方案中，sHASEGP 从靶细胞中分离出，然后作为工具用于鉴定对所述靶细胞具有潜在的特异性的试剂。

[0282] 在另一种实施方案中，受测物质是治疗性化合物，因此，在受测物质存在和受测物质不存在的情况下所测得的 sHASEGP 活性的差异表明靶细胞对治疗性化合物有应答。

[0283] 一种方法包括下述步骤：(a) 将 sHASEGP 多肽或其透明质酸酶结构域与一种或多种化合物在有助于所述配体和所述化合物相互作用的条件下相互接触；和 (b) 在所述的一系列化合物中鉴定出特异性地结合于所述配体的一种或多种化合物。

[0284] 本文中提供的另一方法包括下述步骤：a) 将 sHASEGP 多肽或其透明质酸酶结构域与该 sHASEGP 多肽的底物接触，检测底物的降解，由此评估该 sHASEGP 多肽的活性；b) 在受测物质存在的情况下，将该 sHASEGP 多肽与该 sHASEGP 多肽的底物接触，检测底物的降解，由此评估 sHASEGP 多肽的活性；和 c) 比较在步骤 a) 和 b) 中所评估的 sHASEGP 多肽的活性，从而，由步骤 a) 中测得的活性与由步骤 b) 中测得的活性的差异表明该受测物质调节该 sHASEGP 多肽的活性。

[0285] 在另一种实施方案中，多种受测物质同时被筛选。在比较存在或不存在受测物质时的 HASEGP 多肽活性以评估该受测物质是否是该 sHASEGP 多肽的调节物时，没有必要平行地测定活性，尽管这样的平行测量是常用的。在一个时间点测量 sHASEGP 多肽的活性，并将所测得的活性与该 sHASEGP 多肽的活性历史值相比较是可行的。

[0286] 例如，可以在受测物质存在的情况下测量该 sHASEGP 多肽的活性，并与先前在没有该受测物质的情况下所测得的 sHASEGP 多肽的活性历史值相比较，反之亦然。这可以通过在与用于执行分析的试剂盒一同提供的插页或者小册子上提供该 sHASEGP 多肽的活性数值来实现。

[0287] 用于选择特定 sHASEGP 的底物的方法在实施例中被描述，并例举了特定的透明质酸酶分析方法。

[0288] 提供了联合物以及含有所述联合物并任选地包括用于实施分析的说明书的试剂盒。所述联合物包括 sHASEGP 多肽和待分析的 sHASEGP 多肽的底物，以及可任选的用于检测所述底物的水解的试剂。所述底物，可以是生色或荧光分子，包括糖胺聚糖，可被特定的 sHASEGP 多肽水解，它可以通过测试该 sHASEGP 多肽切割该受测底物的能力而被经验性地鉴定。鉴定出可被最有效地切割的底物，即，以最低的蛋白浓度和 / 或最快的速度或在理想的条件下被切割的底物。

[0289] 本文中还提供了含有上述联合物的试剂盒。该试剂盒可任选地包括鉴定 sHASEGP 多肽的活性的调节物的说明书。任何 sHASEGP 多肽都被考虑作为鉴定其活性的调节物的靶标。

[0290] 2. 结合分析。本文也提供了用于鉴定和分离结合 sHASEGPs 的试剂特别是化合物的方法。这些分析是被设计用来鉴定结合于分离的透明质酸酶结构域（或含有 sHASEGP 多肽的透明质酸酶结构域的非 sHASEGP 多肽的其它蛋白质）的试剂，或结合于包括衍生自全长酶原或衍生自延伸的透明质酸酶结构域的活化形式在内的活化形式的试剂。这样被鉴定

得到的化合物是用于鉴定用来治疗涉及异常透明质酸酶活性的紊乱或疾病的化合物的候选化合物或先导化合物。用于所述方法中的 sHASEGP 多肽包括本文中定义的任何 sHASEGP 多肽，包括 sHASEGP 单链透明质酸酶结构域或其蛋白质水解活性部分。

[0291] 多种方法在本文中被提供。这些方法可以在溶液中或在固相反应中实施，其中，在固相反应中，sHASEGP 多肽或其透明质酸酶结构域通过连接子直接或间接地连接到固体支持物上。筛选分析被描述于实施例中，并且这些分析方法已经被用来鉴定候选化合物。

[0292] 对于本文的目的，所有上述结合分析都是被提供用于 sHASEGP。

[0293] 本文提供了鉴定试剂例如化合物的方法，所述试剂特异性地结合于 sHASEGP 单链透明质酸酶结构域、全长活化的 sHASEGP 或其双链透明质酸酶结构域。该方法可以通过下述步骤来实施：(a) 在有利于 sHASEGP 和试剂之间发生结合的条件下，将 sHASEGP 与一种或多种受测试剂接触；和 (b) 在所述的一系列试剂中鉴定出特异性地结合 sHASEGP 的一种或多种试剂。

[0294] 例如，在实施这样的方法时，将 sHASEGP 多肽与可能的结合伴侣或细胞提取物或细胞级分在允许潜在的结合伴侣与多肽相结合的条件下混合。在混合之后，将已与 sHASEGP 结合的肽、多肽、蛋白或其他分子从混合物中分离出来。结合到 sHASEGP 上的结合伴侣然后可以被移走并作进一步的分析。为了鉴定和分离结合伴侣，整个蛋白质例如 SEQ ID No.1 的整个公开的蛋白质可以被使用。可选择地，可以使用该蛋白质的片段。

[0295] 许多方法都可以被用来获得细胞提取物或体液，诸如血液、血清、尿、汗液、滑液、CSF 和其他这样的液体。

[0296] 例如，可以使用物理或化学破碎方法将细胞破碎。物理破碎方法的例子包括但不限于超声波和机械剪切。化学裂解方法的例子包括但不限于去污剂裂解和酶裂解。为了获得用于本方法的提取物，技术人员可以方便地采用制备细胞提取物的方法。

[0297] 一旦细胞的提取物被制备得到，在蛋白质和结合伴侣能够结合的条件下，将提取物与 sHASEGP 混合。可以使用各种条件，包括类似于人细胞的细胞质中的条件或体液中的条件的条件，所述体液例如血液。特性，例如所使用的细胞提取物的重量克分子渗透浓度、pH、温度和浓度可以被改变，以优化蛋白质与结合伴侣的结合。类似地，用于从体液中分离出感兴趣的分子的方法也是已知的。

[0298] 在合适的条件下混合之后，将结合的复合体从混合物中分离出来。可以使用各种技术来分离混合物。例如，对 sHASEGP 具有特异性的抗体可以被用来免疫沉淀结合伴侣复合体。可选择地，可以使用标准的化学分离技术诸如层析和密度 / 沉淀离心。

[0299] 将提取物中的非结合的细胞组分除去之后，可以使用常规方法，将结合的伴侣从复合体上解离下来。例如，可以通过改变混合物的盐浓度或 pH 来完成解离作用。

[0300] 为了帮助将结合在一起的结合伴侣对从混合提取物中分离出来，可以将 sHASEGP 固定到固体支持物上。例如，该蛋白质可以附着到硝化纤维基质或丙烯酸珠子上。该蛋白质或其片段与固体支持物的粘附有助于将肽 / 结合伴侣对与提取物中的其他组分分离开来。被鉴定出的结合伴侣可以是单个蛋白质或由两个或更多个蛋白质构成的复合物。

[0301] 可选择地，编码单链透明质酸酶的核酸分子可以被用于酵母双杂交系统。酵母双杂交系统已被用于鉴定其他的蛋白伴侣对，并且可以容易地加以应用，以利用本文中描述的核酸分子。

[0302] 其他的体外结合分析，特别是 sHASEGP 的体外结合测定，使用的是多肽的混合物，其至少包括这些蛋白质中的一个的催化结构域和一个或多个候选结合目标或底物。在合适的条件下温育混合物之后，sHASEGP 或其含有催化结构域的多肽片段结合候选底物或与候选底物相互反应的能力被评估。对于无细胞的结合分析，这些成分中的一种成分包括可检测的标记或与可检测的标记偶联。所述标记可以提供直接的检测，诸如放射性、发光性、光密度或电子密度等，或间接的检测，诸如表位标签、酶等。许多方法都可以被用来检测标记，具体取决于标记的性质以及其它的分析成分。例如，可被检测的结合于固体基质的标记物或含有该标记物的结合复合体的一部分，可以从该固体基质上分离出来，然后所述标记可以被检测。

[0303] 3. 信号转导的检测。作为膜锚定蛋白的 sHASEGP，可以直接或间接地涉及信号转导，即，可以直接作为细胞表面受体参与信号转导，或间接地通过激活蛋白质例如能够引发信号转导的促生长因子来参与信号转导。

[0304] 此外，分泌的 sHASEGP，诸如 SEQ ID NO.4 中描述的 sHASEGP 的可溶性结构域可以参与信号转导，或者直接地通过结合到细胞表面受体或与细胞表面受体相互作用而进行，或间接地通过激活蛋白质例如可以引发信号转导的促生长因子而进行。用于评价信号转导的分析方法是本领域技术人员已知的，它们可以适用于 sHASEGP 多肽。

[0305] 提供了用于鉴定可影响或改变信号转导的试剂的分析方法，所述信号转导由 sHASEGP 直接或间接地介导的，特别地，例如通过全长的 sHASEGP 或 sHASEGP 的足以将胞外结构域或其功能部分锚定在细胞表面的部分来激活促生长因子。这样的分析例如包括基于转录的分析，其中，转导信号的调节是通过检测对报告基因表达的影响而被评估的（参见美国专利 5,436,128）。

[0306] 4. 用于鉴定调节编码 sHASEGP 的核酸的表达的试剂的方法。另一实施方案提供了用于鉴定调节 sHASEGP 编码核酸的表达的试剂的方法。这样的分析方法可以使用任何可利用的用于监控编码 sHASEGP 的核酸的表达水平的变化的手段。

[0307] 可以使用任何分析形式来监控试剂调节编码 sHASEGP 的核酸的表达的能力。例如，mRNA 表达可以通过与核酸的杂交而被直接监测。而且，所描述的酶分析方法可以被用来检测可调节 sHASEGP 的表达的试剂。

[0308] 在合适的条件下和在合适的时间，将细胞系暴露于待被测试的试剂，并通过标准的程序分离总 RNA 或 mRNA（参见，例如 Sambrook et al(1989)MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,2nd Ed.Cold Spring HarborLaboratory Press）。用于检测暴露于试剂的细胞和对照细胞之间在 RNA 表达水平上的差异的探针可以由核酸制备得到。通常地，但不是必需的，所设计的探针在高严紧度的条件下只与目标核酸杂交。在高严紧度的条件下，只有高度互补的核酸杂交体形成。因此，分析条件的严紧度决定了为了能够形成杂交体而在两核酸链之间应该存在的互补的数量。应该选择可以将探针 :靶标杂交体和可能的探针 :非靶标杂交体之间的稳定性的差异最大化的严紧度。

[0309] 例如，sHASEGP 的 N 末端和 C 末端片段可以表达在细菌中，并用来搜索与这些片段相结合的蛋白质。融合蛋白，例如在 sHASEGP 的 N 或 C 末端区域融合有 His 标记或 GST 的蛋白可以被制备，以用作底物。这些融合蛋白可以偶联到例如谷胱甘肽 - 琼脂糖珠子上，然后探查细胞裂解物或体液。在裂解之前，细胞或体液可以用候选试剂处理，所述候选试剂能

够调节 sHASEGP 或与其上的结构域相互作用的蛋白。结合于所述融合蛋白的裂解物蛋白可以用 SDS-PAGE 来分辨、通过蛋白质测序或质谱分析进行分离和鉴定，如本领域所知的。

[0310] 抗体探针可以通过使用肽、多肽或蛋白质，采用合适的免疫方案，对合适的哺乳动物宿主进行免疫而制备得到，如果所述的肽、多肽或蛋白质足够长（例如 sHASEGP 多肽的 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40 或更多的连续氨基酸），或者如果需要增强免疫原性的话，可以将它们偶联到合适在载剂上。用于制备携有载剂——例如牛血清白蛋白 (BSA)、匙孔血蓝蛋白 (KLH) 或其他载剂蛋白质——的免疫原性偶联物的方法是本领域已知的。在某些情况下，使用例如碳二亚胺试剂所进行的直接偶联是有效的；在其他例子中，连接试剂诸如那些由 Pierce Chemical Co.，Rockford，IL 提供的试剂是被期望的，它们能使得半抗原容易被接近。半抗原肽可以在带有 Cys 残基的氨基或羧基端处延伸出来，或者缀于多个半胱氨酸残基，例如，这可以方便与载剂的连接。

[0311] 免疫原的施用通常可以通过在一段合适的时间内进行注射来完成，可以与合适的佐剂一同使用，如本领域常规理解的。在实施免疫方案期间，对抗体进行滴定，以确定形成了足够的抗体。

[0312] 抗肽抗体 (anti-peptide antibodies) 可以应用合成的肽来产生，所述的合成的肽例如对应于 sHASEGP 的羧基末端氨基酸。

[0313] 合成肽的长度可以小至 1-3 个氨基酸，通常至少 4 个氨基酸残基或更长。可以使用的标准方法，将肽偶联到 KLH，并将其免疫到动物诸如兔或有蹄类动物中。然后可以纯化出多克隆抗体，例如使用含有共价结合的肽的 Actigel 珠子进行纯化。

[0314] 尽管使用这种方法产生的多克隆抗血清可以满足某些应用，例如药物组合物，但通常是使用单克隆制剂。如通常所知道的，通过使用 Kohler 等人的标准方法 (Nature 256：495-7(1975) 或进行修饰——该修饰可以实现淋巴细胞或脾细胞的无限增殖，可以制备出分泌期望的抗体的无限增殖细胞系。通过免疫测定，筛选出分泌期望的抗体的无限增殖细胞系，其中，抗原是肽半抗原、多肽或蛋白质。

[0315] 当分泌期望抗体的合适的无限增殖细胞系被鉴定出之后，该细胞可以借助于腹水在体外培养或在体内产生。特别有价值的是识别 sHASEGP 的催化结构域或活化切割位点（区域）的单克隆抗体。

[0316] 也可以产生抗体或片段。特异性地结合受体的期望区域的区域也可以利用多个物种来源以嵌合体的形式产生。

[0317] 在上述方法中被分析的试剂可以是被随机选择的或者被理性选择或设计的。

[0318] 试剂可以是例如肽、小分子和碳水化合物。本领域技术人员容易理解，对试剂的结构性质是没有限制的。

[0319] 如本领域所知道的，肽试剂可以使用标准的固相（或液相）肽合成方法来制备。此外，编码这些肽的 DNA 可以使用商业上可获得的寡核苷酸合成仪器合成，并使用标准的重组生产系统重组产生。如果欲包括进非基因编码的氨基酸，则使用固相肽合成的生产方法是必需的。

[0320] I. 治疗方法

[0321] 由本文中的方法鉴定出的 sHASEGP 被用于治疗或预防 sHASEGP 底物在动物特别是哺乳动物包括人中的异常积聚。在一种实施方案中，该方法包括给予哺乳动物有效量的

sHASEGP 多肽，从而疾病或紊乱得以治疗或预防。

[0322] 在另一实施方案中，sHASEGP 抑制剂可以被用于处理过量的中性透明质酸酶活性。被处理的哺乳动物可以是人。本文中所使用的抑制剂是那些通过筛选分析鉴定出来的抑制剂。此外，考虑了抗体或反义核酸或双链 RNA(dsRNA)，诸如 RNAi。

[0323] 1. 反义治疗 (antisense treatment)：在特定的实施方案中，如上文所描述的，sHASEGP 多肽功能可以被 sHASEGP 多肽反义核酸降低或抑制，从而治疗或预防过度的软骨素酶活性。提供了至少 6 个核苷酸，一般可高达 150 个核苷酸的核酸的治疗或预防用途，这些核酸对于编码 sHASEGP 多肽或其部分的基因或 cDNA 是反义的。本文中所使用的 sHASEGP 多肽“反义”核酸指这样的核酸，其借助于一定程度的序列互补性，并且通常在高严紧度的条件下，能够与 sHASEGP 多肽 RNA（一般是 mRNA）的一部分序列相杂交的核酸。反义核酸可以与 sHASEGP 多肽 mRNA 的编码和 / 或非编码区域相互补。这样的反义核酸具有治疗剂的用途，其可以减弱或抑制 sHASEGP 多肽功能，可以用于治疗或预防上述的紊乱。

[0324] sHASEGP 多肽反义核酸至少 6 个核苷酸，通常是寡核苷酸（范围在 6 至约 150 个核苷酸内，包括 6 至 50 个核苷酸）。反义分子可以与透明质酸酶结构域的所有或部分序列互补。例如，寡核苷酸至少 10 个核苷酸、至少 15 个核苷酸、至少 100 个核苷酸或至少 125 个核苷酸。寡核苷酸可以是 DNA 或 RNA 或嵌合混合物或其衍生物或修饰形式，可以单链的或双链的。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸骨架上有修饰。寡核苷酸可以包括其他附加的基团，诸如肽或有助于转运通过细胞膜的试剂（参见，例如 Letsinger et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86：6553-6556(1989)；Lemaitre et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84：648-652(1987)；PCT 公开号 WO 88/09810，公开于 1988 年 12 月 15 日）或有助于转运通过血脑屏障的试剂（参见例如 PCT 公开号 WO 89/10134，公开于 1988 年 4 月 25 日）、杂交引发切割试剂 (hybridization-triggered cleavage agents)（参见例如 Krol et al.，BioTechniques6：958-976(1988)）或间插试剂（参见例如 Zon.Pharm.Res.5：539-549(1988)）。

[0325] sHASEGP 多肽反义核酸通常是寡核苷酸，通常是单链 DNA 或 RNA 或其类似物或其混合物。例如，该寡核苷酸包括与编码人 sHASEGP 多肽的核酸的一部分序列反义的序列。寡核苷酸可以用本领域已知的取代物在它的结构的任何位置进行修饰。

[0326] sHASEGP 多肽反义寡核苷酸可以包括至少一个经修饰的碱基部分，其可以选自下列但不限于下列：5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰胞嘧啶、5-（羧基羟甲基）尿嘧啶、5- 羧基甲基氨甲基 -2- 硫尿苷、5- 羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β -D-galactosylqueosine、次黄嘌呤核苷、N6- 异戊烯基腺嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基次黄嘌呤核苷、2,2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、N6- 腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲基氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨基甲基 -2- 尿嘧啶、β -D-mannosylqueosine、5-apos- 甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲巯 -N6- 异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 羟基乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2- 硫代胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫代尿嘧啶、2- 硫代尿嘧啶、4- 硫代尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 羟基乙酸甲基酯、尿嘧啶 -5- 氧乙酸 (v)、5- 甲基 -2- 硫代尿嘧啶、3-(3- 氨基 -3-n-2- 羧基丙基）尿嘧啶、(ACP3)w 和 2,6- 二氨基嘌呤。

[0327] 在另一实施方案中，寡核苷酸包括至少一个修饰的糖部分，其可以选自下述但不

限于下列：阿拉伯糖、2- 氟阿拉伯糖、木酮糖和已糖。寡核苷酸可以包括至少一个修饰的磷酸骨架，其选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基硫代磷酸酯 (phosphoramidothioate)、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、烷基磷酸三酯和甲乙缩醛 (formacetal) 或其类似物。

[0328] 寡核苷酸可以是 a- 异头 (anomeric) 寡核苷酸。a- 异头寡核苷酸与互补 RNA 形成特异性的双链杂交体，其中，双链相互平行 (Gautier et al.，Nucl.Acids Res.15：6625-6641(1987))。

[0329] 寡核苷酸可以联接到另一分子，例如但不限于肽；杂交引发交联试剂 (hybridization triggered cross-linking agent)、转运试剂或杂交引发切割试剂 (hybridization-triggered cleavage agent)。寡核苷酸可以使用本领域已知的标准方法合成，例如使用自动 DNA 合成仪 (例如可以商购自 Biosearch，Applied Biosystems 等)。例如，硫代磷酸酯寡核苷酸可以使用 Stein et al.，Nucl.Acids Res.16：3209(1988) 的方法合成；甲基膦酸酯寡核苷酸可以通过使用可控有孔玻璃聚合物支持物 (controlled pore glass polymer supports) 来制备 (Sarin et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85：7448-7451(1988)) 等。在特定的实施方案中，sHASEGP 多肽反义寡核苷酸包括具有催化活性的 RNA 或核酶 (参见如 PCT 国际公布 WO 90/11364，公开于 1990 年 10 月 4 日；Sarver et al.，Science 247：1222-1225(1990))。在另一实施方案中，寡核苷酸是 2′ -O- 甲基核糖核苷酸 (Inoue et al.，Nucl.Acids Res.15：6131-6148(1987))，或嵌合的 RNA-DNA 类似物 (Inoue et al.，FEBS Lett.215：327-330(1987))。

[0330] 可选择地，寡核苷酸可以是双链 RNA(dsRNA)，诸如 RNAi。

[0331] 在可选择的实施方案中，sHASEGP 多肽反义核酸通过外源序列的转录而在细胞内产生。

[0332] 例如，载体可以被导入体内，这样它被细胞吸收，在该细胞中，载体或其一部分被转录，产生反义核酸 (RNA)。这样的载体将含有编码 sHASEGP 多肽反义核酸的序列。这样的载体可以保持为附加体的形式或整合入染色体，只要它能被转录以产生期望的反义 RNA。这样的载体可以用本领域标准的重组 DNA 技术构建得到。载体可以是质粒、病毒或本领域已知的其他载体，它们可以用于在哺乳动物细胞内的复制和表达。编码 sHASEGP 多肽反义 RNA 的序列的表达可以借助于本领域已知的在包括人在内的哺乳动物的细胞中起作用的任何启动子。这样的启动子可以是诱导型的或组成型的。这样的启动子包括但不限于：SV40 早期启动子区域 (Bernoist and Chambon，Nature 290：304-310(1981))；包含在劳斯肉瘤病毒的 3′ 长末端重复序列中的启动子 (Yamamoto et al.，Ce//22：787-797(1980))；疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78：1441-1445(1981))；金属硫蛋白基因的调控序列 (Brinster et al.，Nature 296：39-42(1982)) 等。

[0333] 反义核酸包括这样的序列，即，该序列与 HASEGP 多肽基因——包括人 sHASEGP 多肽基因——的 RNA 转录子的至少一部分互补。绝对的互补是不被要求的。可有效地治疗或预防赘生性疾病的 sHASEGP 多肽反义核酸的量取决于疾病的性质，并且可以通过标准的临床技术经验性地确定。

[0334] 如果可能，在用人进行测试和进行应用之前，在体外测定在细胞中的反义细胞毒性 (antisense cytotoxicity) 然后再在有用的动物模型系统中进行测定是被需要的。

[0335] 2.RNA 干扰。RNA 干扰 (RNAi)(参见例如 Chuang et al.(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:4985) 可以被用来抑制编码 sHASEGP 的基因的表达。干扰 RNA(RNAi) 片段，特别是双链 (ds)RNAi 可以被用来产生 sHASEGP 功能的丧失。在生物体中，包括哺乳动物、线虫 (C.elegans)、果蝇和植物以及人中，使用 RNAi 来使得基因沉默的方法是已知的(参见例如 Fire et al.(1998)Nature 391:806-811;Fire(1999)Trends Genet.15:358-363;Sharp(2001)Genes Dev.15:485-490;Hammond etal.(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)Nature411:494-498;国际 PCT 申请 WO 01/29058;国际 PCT 申请 WO 99/32619)。

[0336] 表达双链 RNA(dsRNA) 的构建物被导入宿主，诸如动物和植物，其中使用可保持为附加体或者可整合入基因组的可复制载体。通过选择合适的序列，dsRNA 的表达可以干扰编码 sHASEGP 的内源 mRNA 的积聚。RNAi 也可以在体外被用来抑制表达。

[0337] 包括有至少约 21(或 21) 个对 sHASEGP 具有选择性的(即，对 sHASEGP 是独特的)核苷酸的区域，被用来制备 RNAi。约 21 个核苷酸的小片段可以直接(即，在体内或在体外)转化入细胞中；更大的 RNAi dsRNA 分子通常通过使用编码它们的载体而被导入细胞中。dsRNA 分子至少约 21bp 长或更长，例如 50、100、150、200 或更长。在体外或体内，将核酸分子导入细胞的方法、试剂和实验方案是本领域技术人员知道的。

[0338] 3. 基因疗法。在示范性的实施方案中，借助于基因疗法，给予包括编码 sHASEGP 多肽或其功能结构域或其衍生物的核苷酸序列的核酸，以促进 sHASEGP 多肽功能。基因疗法是指通过将核酸给予患者而进行的治疗。在该实施方案中，由核酸产生它的编码蛋白，而该蛋白通过促进 sHASEGP 多肽功能来实现治疗效果。可以使用任何本领域可利用的用于基因治疗的任何方法(参见 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); 和 Morgan and Anderson,An.Rev.Biochem.62:191-217(1993);TIBTECH 115:155-215(1993))。例如，用于基因治疗的一种治疗组合物包括编码 sHASEGP 多肽的序列，其是表达载体的一部分，可以在合适的宿主中表达 sHASEGP 多肽或其结构域、片段或嵌合蛋白。特别地，这样的核酸具有与 sHASEGP 多肽编码区域有效连接的启动子，该启动子是诱导型的或组成型的，并且，可任选地，可以是组织特异性的。在另一特定的实施方案中，使用这样的核酸分子，在该核酸分子中，有助于在基因组的期望位点发生同源重组的区域位于 sHASEGP 多肽编码序列和任何其他期望的序列的两侧，从而使得 sHASEGP 蛋白质核酸可以在染色体中表达 (Koller and Smithies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8932-8935(1989);Zijlstra et al.,Nature 342:435-438(1989))。

[0339] 将核酸传送到患者，可以是直接的，在这种情况下，病人被直接暴露于核酸和携带核酸的载体，或可以间接的，在这种情况下，细胞首先用核酸进行体外转化，然后移植到患者中。这两种途径都是已知的，分别称为体内或离体基因疗法。

[0340] 在特定的实施方案中，核酸被直接体内给药，在体内，它被表达从而产生被编码的

产物。这可以通过利用本领域已知的许多方法中的任何方法来实现，诸如将其构建为合适的核酸表达载体的一部分并将它给予患者，由此，它变为细胞内的物质，这可以例如通过使用缺陷的或减毒的逆转录病毒或其他病毒载体来实现（参见美国专利 4,980,286），或通过直接注射裸 DNA，或通过使用微粒轰击法（例如基因枪 ;Biolistic，Dupont），或包覆以脂质或细胞表面受体或转染试剂，封装在脂质体、微颗粒或微胶囊中，或通过将其连接到已知能进入核内的肽上并将它给予患者，或通过将其连接到将遭受受体介导的胞吞作用的配体并将它给予患者（参见如 Wu and Wu，J.Biol.Chem,262 :4429-4432(1987))（其可以被用来靶向特异性表达某些受体的细胞类型），等等。在另一实施方案中，可以形成核酸 - 配体复合物体，在该复合物中，配体是破坏核内体的促融合性病毒肽，这使得核酸可以免遭溶酶体降解。在另一个实施方案中，通过靶向特异性的受体，核酸可以在体内被作为靶标，被细胞特异性地吸收和表达（参见例如 PCT 公布 WO 92/06180，日期为 1992 年 4 月 16 日，(Wu et al.) ;WO 92/22635，日期为 1992 年 12 月 23 日 (Wilson etal.) ;WO 92/20316，日期为 1992 年 11 月 26 日 (Findeis et al.) ;WO 93/14188，日期为 1993 年 7 月 22 日 (Clarke et al.)，WO 93/20221，日期为 1993 年 10 月 14 日 (Young))。可选择地，核酸可以被导入细胞内，并整合入宿主细胞 DNA 中以便于表达，这是通过同源重组进行的 (Koller and Smithies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 :8932-8935(1989) ;Zijistra et al.,Nature 342 :435-438(1989))。

[0341] 在特定的实施方案中，可以使用含有 sHASEGP 多肽核酸的病毒载体。例如，可以使用逆转录病毒载体（参见 Miller et al.，Meth.Enzymol.217 :581-599(1993))。这些逆转录病毒载体已被修饰以剔除对于病毒基因组的包装和整合入宿主细胞 DNA 是非必要的逆转录病毒序列。用于基因疗法的 sHASEGP 多肽核酸被克隆入载体，其帮助基因传送到患者中。关于逆转录病毒载体的更为详细的描述可以参见 Boesen et al.,Biotherapy 6 :291-302(1994)，其公开了使用逆转录病毒载体将 mdr1 基因传送给造血干细胞，以便使干细胞对化学疗法更具抗性。

[0342] 阐述逆转录病毒载体在基因治疗中的应用的其他参考文献是 :Clowes et al.，J.Clin.Invest.93 :644-651(1994) ;Kiem et al.，Blood 83 :1467-1473(1994) ;Salmonsand Gunzberg,Human Gene Therapy 4 :129-141(1993) ;和 Grossman and Wilson，Curr.Opin.In Genetics And Devel.3 :110-114(1993)。

[0343] 腺病毒是可以用于基因治疗的另一种病毒载体。腺病毒是可以用来将基因传送给呼吸上皮细胞的特别具有吸引力的载体。腺病毒天然地感染呼吸上皮细胞，在那里它们引起轻微的疾病。基于腺病毒的传送系统的其他靶标是肝、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感染未分裂细胞的优点。Kozarsky andWilson，Current Opinion in Genetics and Development 3 :499-503(1993) 综述了基于腺病毒的基团治疗。Bout et al.,Human Gene Therapy 5 :3-10(1994) 证明了使用腺病毒载体将基因转移到猕猴的呼吸上皮细胞。腺病毒在基因治疗中的应用的其他例子参见 Rosenfeld et al.,Science 252 :431-434(1991) ;Rosenfeld et al.，Cell 68 :143-155(1992) ;和 Mastrangeli et al.，J.Clin.Invest.91 :225-234(1993)。

[0344] 腺相关病毒 (AAV) 已被提议用于基因疗法 (Walsh et al.，Proc.Soc.Exp.Biol.Med.204 :289-300(1993))。

[0345] 基因治疗的其他途径涉及，通过诸如电穿孔、脂转染、磷酸钙介导转染或病毒感染的方法，将基因转移到组织培养物的细胞中。通常，转移的方法包括将选择性标记转移到细胞中。然后对细胞进行选择，以分离出已经吸收并正在表达被转移的基因的那些细胞。然后将那些细胞传送给患者。

[0346] 在这种实施方案中，将核酸导入细胞，然后再在体内给予所得到的重组细胞。这种导入可以用本领域已知的任何方法进行，包括但不限于转染、电穿孔、微注射、用含有核酸序列的病毒或噬菌体载体进行感染、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞(microcell)介导的基因转移、原生质体融合等。用于将外源基因导入细胞的许多技术是本领域已知的(参见如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))，并且它们都可以被使用，只要作为接受者的细胞的必要的发育和生理功能不被破坏。该技术应该能够稳定地将核酸转移入细胞中，这样，核酸被细胞表达并且通常能遗传给子代细胞并被子代细胞表达。

[0347] 所获得的重组细胞可以通过本领域已知的各种方法被传送给患者。在一种实施方案中，上皮细胞被注射，例如进行皮下注射。在另一实施方案中，重组皮肤细胞可以用作皮移植片，移植到患者上。重组血细胞(例如造血干细胞或祖先细胞)可以通过静脉给予。欲使用的细胞的数量取决于所想要的效果、患者的状态等，并可以由本领域技术人员确定。

[0348] 可以导入核酸以便实施基因治疗的细胞包括任何期望的可以利用的细胞类型，包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、角质化细胞、成纤维细胞、肌肉细胞、肝细胞；血细胞诸如T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、粒细胞；各种干细胞或祖细胞，特别是造血干细胞或祖细胞，例如诸如从骨髓、脐带血、外周血、胎儿肝脏和其他来源获得的细胞。

[0349] 例如，用于基因治疗的细胞对于患者是自体的。在重组细胞被用于基因治疗的实施方案中，sHASEGP多肽核酸被导入细胞中，这样，它被细胞或它们的子代表达，然后该重组细胞被体内施用以获得治疗效果。在特定的实施方案中，使用干细胞或祖细胞。依据该实施方案，可以体外分离和培养的任何干细胞和/或祖细胞都具有潜在应用价值。

[0350] 这样的干细胞包括但不限于造血干细胞(HSC)、上皮组织诸如皮和肠内膜(lining)的干细胞、胚胎心脏干细胞、肝脏干细胞(PCT公开号WO 94/08598,日期为1994年4月28日)和神经干细胞(Stemple and Anderson,Cell 71:973-985(1992))。

[0351] 上皮干细胞(ESC)或角质化细胞可以通过已知的程序从组织诸如皮肤和肠内膜获得(Rheinwald,Meth.Cell Bio.21A:229(1980))。在成层上皮组织诸如皮肤中，通过胚层——最靠近基膜的层——内的干细胞的有丝分裂，发生更新作用(renewal)。肠内膜内的干细胞使得该组织可以快速的更新。从患者或供体的皮肤或肠内膜获得的ESC或角质化细胞可以培养在组织培养基中(Rheinwald,Meth.Cell Bio.21A:229(1980);Pittelkow and Scott,Cano.Clinic Proc.61:771(1986))。如果ESC由一个供体提供，也可以使用抑制宿主对移植物的反应活性的方法(例如放射、给予药物或抗体，以促进温和的免疫抑制)。

[0352] 至于造血干细胞(HSC)，能分离、增殖或体外培养HSC的任何技术都可以用于本实施方案中。可以被用来实现这些实施方案的技术包括(a)从骨髓细胞分离并建立HSC培养物，所述骨髓细胞分离自未来的宿主或者供体；(b)应用先前建立的长期HSC培养物，其可

以是过敏原性的或异种的。

[0353] 在使用非自体的HSC时，通常也使用抑制未来宿主/患者的移植免疫反应的方法。在特定的实施方案中，人骨髓细胞可以通过针吸法(needle aspiration)从后髂嵴获得(参见例如Kodo et al.，J.Clin.Invest.73:1377-1384(1984))。例如，HSC可以制备成高度富集或基本上纯的形式。所述的富集可以在长期培养之前、期间或之后完成，并且可以使用本领域已知的任何技术来进行。骨髓细胞的长期培养可以通过使用例如修饰的Dexter细胞培养技术(Dexter et al.，J.Cell Physiol.91:335(1977))或Witlock-Witte培养技术(Witlock and Witte，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:3608-3612(1982))来建立和维持。

[0354] 在特定的实施方案中，待被导入以进行基因治疗的核酸包括有效连接于编码区域的诱导型启动子，这样，该核酸的表达通过控制合适的转录诱导物的存在或不存在而得以控制。

[0355] 3.药物前体(prodrugs)-提供了治疗肿瘤的方法。该方法通过给予药物前体而得以实施，该药物前体被HASEGP在特定的位点切割从而释放出活性药物或能够在体内被转化为活性药物的前体(precursor)。一旦与表达sHASEGP活性的细胞接触，所述药物前体被转化为活性药物。药物前体可以是共轭物(或称为偶联物)，其含有连接到目标sHASEGP的底物上的活性试剂，诸如抗肿瘤药物，例如细胞毒性试剂或其他治疗试剂(TA)，这样，该共轭物中的药物或试剂是无活性的或者不能进入细胞，但是在切割之后便被激活。例如，药物前体可以含有硫酸软骨素分子，通常是相对短的小于约20个双糖单位的，其被目标sHASEGP催化切割。细胞毒性试剂包括但不限于烷化剂、抗增殖剂和微观蛋白结合试剂。其他的包括长春花类药物(vinca drugs)、丝裂霉素、争光霉素和紫杉醇。

[0356] J.药物组合物和给药方式

[0357] 1.组合物的成分。本文提供了含有活性sHASEGP的药物组合物。本文也提供了调节sHASEGP多肽活性的化合物与其它的用于治疗透明质酸酶紊乱的疗法或化合物诸如抗体化合物的联合。

[0358] sHASEGP多肽和另外的试剂可以作为分离开的组合物进行包装，以便可以一起给药或连续给药或间断给药。可选择地，它们可以提供为单一的组合物来施用，或提供为两种组合物但给药时作为单一的组合物。所述的这些联合可以包装为试剂盒。

[0359] 2.制剂和给药途径

[0360] 本文中提供的sHASEGP多肽和其可溶性人透明质酸酶结构域可以配制成药物组合物，通常用于单剂量给药。所述制剂中的多肽的浓度可以用效地传送在给药之后对于目的治疗为有效的量。通常，组合物被配制成便于单次剂量给药的形式。为了配制组合物，一定重量分数的sHASEGP多肽、其可溶性人透明质酸酶结构域或其混合物以有效的浓度溶解、悬浮、分散或者混合于所选择的媒介物中，这样，被治疗的症状可以被缓解或改善。

[0361] 适用于本文提供的sHASEGP或其可溶性人透明质酸酶结构域的给药的药物载体或媒介物包括本领域技术人员所知道的适用于特定的给药模式的任何载体。

[0362] 此外，多肽可以作为组合物中唯一的药物活性组分而配制于组合物中，或者，可以与其他活性组分组合。脂质体悬浮液，包括以组织为靶标的脂质体，也可以用作药物学上可接受的载体。这些都可以依据本领域技术人员已知的方法来制备。例如，脂质体制剂可以按美国专利4,522,811中所述的制备。

[0363] 活性 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域被包括于药物学上可接受的载体中，其数量足以在不对被治疗的患者产生不利副作用的情况下产生治疗上有用的效果。治疗上有效的浓度可以通过在已知的体外和体内系统中测试多肽而经验性地确定，例如其中可以使用本文中提供的分析方法，或参见 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；Steinkühler et al.(1998)Biochem.37：8899-8905；D ′ Souzaet al.(1995)J.Gen.Virol.76：1729-1736；Takeshita et al.(1997)Anal.Biochem.247：242-246；也参见例如 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；Mizutaniet al.(1995)Biochem.Biophys.Res.Commun.212：906-911；Cho et al.(1997)J.Virol.Meth.65：201-207，然后由此推断出用于人的剂量。

[0364] 通常，考虑治疗上有效的剂量。被给予的量可以在每毫升血液体积 0.001 至 1mg 的级别，包括约 0.005-0.05mg/ml 血液体积和约 0.01mg/ml 血液体积。制备药物的单元剂量形式 (Pharmaceutical dosage unit forms)，其在每单元剂量形式中可提供约 1mg 至约 1000mg 的必需活性组分或必需组分的组合，包括约 10 至约 500mg，包括约 25-75mg 的必需活性组分或必需组分的组合。精确的剂量可以经验性地确定。

[0365] 在一些例子中，优选高单元剂量的人 sHASEGP。例如，对于 sHASEGP 的静脉内给药，优选的 sHASEGP 浓度为每毫升 500-100,000 单位。冻干的 sHASEGP 制剂对于保存大的单元剂量的 sHASEGP 是理想的。考虑将 200,000 单位的 sHASEGP 冻干小瓶装制剂用于静脉内传送。

[0366] 高浓度的剂量也被考虑用于传送小体积的 sHASEGP。在白内障和有晶体眼人工晶体植入手术期间，考虑将 10-100μl 的 5000 单位 /ml 的 sHASEGP 注射入眼睛前房，以溶解之前施用的粘弹性物质。50-200U/ml 剂量的小体积注射也被考虑用于玻璃体内操作，例如治疗糖尿病视网膜病的玻璃体出血或玻璃体视网膜脱落。

[0367] 活性组分可以一次给予，或者可以分为较小的剂量，间隔一段时间给药。可以理解的是，精确的剂量和治疗的持续时间取决于正在被治疗的疾病，并且可以使用已知的测试方案经验性地确定，或由体内或体外的测试数据推出。应该注意的是，浓度或剂量值也可以随待减轻的症状的严重程度而有所变化。进一步应该理解的是，对于任何特定的患者，具体的剂量方案应该随着时间的推移，根据个体的需要以及实施和监控该组合物的给药的人员的专业判断作出调整，应该理解本文中所阐述的浓度范围仅仅是示范性的，不是为了限制所要求保护的组合物和含有它们的联合物的范围或应用。

[0368] 药学上可接受的衍生物包括酸、盐、酯、氢氧化物、溶剂化形式和药物前体形式。通常所选择的衍生物的药物动力学特性优于对应的中性 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域。

[0369] 因此，为了全身性的、外部的或局部的给药，将有效浓度或数量的一种或多种在本

文中提供的多肽或其药学上可接受的衍生物与合适的药物载体或媒介物混合，从而形成药物组合物。sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域以可有效地改善或治疗正被考虑处理的紊乱的量包括在其中。组合物中活性多肽的浓度取决于活性多肽的吸收、失活、排放率、给药方案、给药量、具体剂型以及本领域技术人员已知的其他因素。

[0370] 用于本方法的治疗剂可以通过本领域技术人员已知的任何途径来施用，例如但不限于局部给药、关节内给药、脑池内给药、眼内给药、心室内给药、鞘内给药、静脉内给药、肌内给药、腹腔内给药、皮内给药、气管内给药以及其中的任何两种或更多种给药途径的组合。也可尝试干粉状肺制剂 (dry powder pulmonaryformulations)。

[0371] 最合适的给药途径将依据所打算的用途而变化，所述的用途例如用作传送试剂 (delivery agent) 以促进液体的皮下传送、用来降低接受粘弹性物质的青光眼患者的眼内压力，或用作“扩散剂”以增强化学治疗剂的活性，还将依据感兴趣的位置而变化，所述的位置例如具体的内脏、肿瘤生长物、眼内腔和表皮。给药的方式包括但不限于外部给药、局部给药、关节内给药、脑池内给药、眼内给药、心室内给药、鞘内给药、静脉内给药、肌肉内给药、气管内给药、腹腔内给药、皮内给药以及其中的任何两种或更多种给药方法的组合。例如，对于各种癌症的治疗，例如鳞状细胞癌、乳腺癌、膀胱癌和肠胃癌的治疗，局部给药，包括给药于肿瘤生长的位点（例如，鞘内给药、心室内给药或脑池内给药），是有益的，其优点在于，治疗剂可以高的浓度被施用，而无并发症的危险，而这些并发症会伴随着治疗剂的全身性给药而发生。

[0372] 适合用于本文中提供的 sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域的给药的药物或饰容载体或媒介物包括本领域技术人员已知的适合于该特定的给药方式的任何载体。此外，多肽可以作为组合物中唯一的药学上具有活性的组分而被配制，或可以与其他活性组分组合配制，其中，所述的其他活性组分不会损害所想要的作用，或与能够补充所想要的作用的材料组合配制，这是本领域技术人员所知道的。例如，本文中提供的 sHASEGP 多肽可以作为传送试剂或“扩散”剂与另一活性化合物组合，以促进所述的另一活性组分的传送或增强所述的另一活性组分的活性，所述的另一活性化合物例如治疗活性试剂，包括但不限于药物或药物前体。在特定的实施方案中，sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域可以与麻醉剂诸如利多卡因、布比卡因或两者的化合物以及可任选的激素试剂例如肾上腺素共同配制成制剂，以在眼科手术期间减少或停止血液摄取。sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域可以与各种化学治疗剂例如毒素和肿瘤坏死因子共同配制成制剂，以增强所述化学治疗剂的活性和 / 或目标肿瘤对所述化学治疗剂的可接触性。活性化合物以足以产生治疗上有用的效果而不对接受治疗的个体产生严重的毒性作用的量包含于载体中。有效浓度可以通过使用体外或体内系统——包括本文中描述的动物模型——来测试化合物而经验性地确定。

[0373] 用于肠胃外、皮内、皮下或外部应用的溶液或悬浮液，可以包括下述的任何成分：无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他的合成溶剂；抗菌剂，例如苯甲醇和对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸和亚硫酸氢钠；掩蔽剂 (cheating agents)，例如乙二铵四乙酸 (EDTA)；缓冲液，例如醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液；以及用于调整渗透压的试剂，包括但不限于氯化钠、氯化钙、氯化镁、右旋糖、丙三醇或硼酸。肠胃外给药的制剂可以装入由玻璃、塑料或其他合适材料制成的安

瓶、一次性注射器或者单剂量或多次剂量的小瓶中。

[0374] sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域可以以微粉化的形式或其他合适的形式被悬浮，或可以被衍生化以产生更加可溶性的活性产物或产生药物前体。所得到的混合物的形式取决于许多因素，包括预期的给药方式和多肽在所选择的载体或媒介物中的溶解性。有效的浓度是足以改善目标症状的浓度，并可以使用本领域技术人员已知的方法经验性地确定。为了配制组合物，一定重量分数的多肽以可有效缓解或改善的所要治疗的症状的浓度被溶解、悬浮、分散或者混合于所选择的媒介物中。

[0375] 在 sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域显示出不足的溶解性的情形下，可以使用溶解多肽的方法。此类方法是本领域技术人员知道的，包括但不限于使用辅助溶剂诸如二甲亚砜 (DMSO)、使用表面活性剂诸如 TWEEN®和 Pluronic®F68；或者溶解在含水碳酸氢钠中。多肽的衍生物，诸如多肽的药物前体，也可以用于配制有效的药物组合物。对于眼科适应症，将组合物配制在眼科可接受的载体中。对于本文中的眼科用途，考虑局部给药，这可以通过外部给药或通过注射给药来进行。缓时释放制剂也是理想的。通常，组合物可以配制成用于单剂量给药的形式，这样的单次剂量可以提供有效的数量。

[0376] 在将多肽与媒介物混合或将多肽加入媒介物后，所得到的混合物可以是溶液、悬浮液、乳液或其他组合物，并可以配制成含水混合物、乳液、胶状物、药膏、乳剂、溶液、酏剂、洗液、悬浮液、酊剂、糊状、泡沫、气溶胶、灌洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带形式或任何其他的适于全身性给药、外部给药或局部给药的制剂形式。

[0377] 所得的混合物的形式取决于许多因素，包括预期的给药方式和化合物在所选择的载体或媒介物中的溶解性。如果必要的话，可以制备成化合物的药学上可接受的盐或其他衍生物。对于局部的内部给药，诸如肌肉内给药、肠胃外给药或关节内给药，化合物优选用含水介质例如等渗缓冲盐水配制成悬浮溶液，或者与适用于内部给药的生物相容性支持物或生物粘合剂组合起来。

[0378] sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域被包括于药学上可接受的载体中，其数量足以在不对接受治疗的患者产生不利副作用的情况下产生治疗上有用的效果。应该理解的是，副作用的数量和程度取决于化合物被给药时的情况。例如，某些毒性的和不利的副作用在治疗威胁生命的疾病时是可以接受的，而在治疗具有较轻后果的紊乱时则是无法接受的。对治疗用途而言有效的量当然将取决于疾病的严重性和患者的体重和总体状态以及给药途径。尽管在局部给药之后治疗剂的局部浓度在某些情况下可能高于全身性给药后安全获得的浓度，但治疗剂的局部给药通常需要比任何方式的全身性给药的剂量都要小的剂量。

[0379] 因为各个患者的症状的严重程度各有不同，而且每种治疗剂都具有其独特的治疗特性，所以实施人员应该确定患者对治疗的反应，并相应地改变剂量。在体外使用的剂量可以为药学组合物的原位施用数量提供有用的指导，并且动物模型在某些情况下可以被用来确定治疗具体的紊乱时的有效剂量。总的来说，对于局部给药，可以考虑，治疗剂的有效量为每 kg 体重约 0.1 皮克 (pg) 至约 1ng 的范围内。获得有效剂量时的各种考虑因素对本领域技术人员来说是已知的，并已被描述 (参见如 Goodman And Gilman′ s :The Pharmacological Bases of Therapeutics,8thed.,Pergamon Press,1990 ;Remington′ s Pharmaceutical Sciences,17th ed.,MackPublishing Co.,Easton,Pa.,1990 ;和 Mantyh

et al.，Science，278：275-79，1997，其涉及鞘内注射神经元特异性配体－毒素，其中的每一篇文献都通过引用方式整体并入本文）。

[0380] 本文中应用的 sHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域的制剂包括那些适用于口服给药、直肠给药、外部给药、吸入给药、口腔含化给药（例如舌下含化给药）、肠胃外给药（例如皮下、肌肉内、皮内或静脉内）、透皮给药或任何给药途径的制剂。在任何给定情况下的最合适的途径取决于正在治疗的症状的性质和严重性，以及正在使用的特定活性化合物的性质。制剂可以以单元剂量形式给予人和动物，诸如片剂、胶囊、药丸、粉剂、颗粒、无菌肠胃外给药溶液或悬浮液、口服给药溶液或悬浮液、和油－水乳剂，它们都含有合适数量的多肽和／或其他试剂或其药学上可接受的衍生物。药学上具有治疗活性的多肽和／或其他试剂和其衍生物通常以单元剂量形式或多剂量形式配制并给药。本文中所使用的单元剂量形式是指适用于人和动物个体的物理上独立的单元，它们被独立包装，如本领域已知的。

[0381] 药物组合物可以以单元剂量形式给予人和动物，诸如片剂、胶囊、药丸、粉末、颗粒、无菌肠胃外给药溶液或悬浮液、口服给药溶液或悬浮液、和油－水乳剂，它们都含有合适数量的 sHASEGP 多肽和／或其可溶性人透明质酸酶结构域和可任选的另一试剂或其药学上可接受的衍生物。药学上具有治疗活性的化合物和／或其衍生物通常以单元剂量形式或多剂量形式配制并给药。本文中所使用的单元剂量形式是指适用于人和动物个体的物理上独立的单位，并独立地包装，如本领域已知的。每一单元剂量含有足以产生期望的治疗效果的预先确定数量的治疗上有活性的化合物，所述化合物与必需的药物载体、媒介物或稀释剂结合。单元剂量的形式的例子包括但不限于安瓿、注射器和各自包装的片剂或胶囊。例如，含有稳定溶液和 1 至 5000 单位的 sHASEGP 的小体积诸如 5 至 50μl 的制剂可以预先包装于注射器中，例如可以在粘弹性试剂注射之后使用。单元剂量形式可以以其小部分给药或多倍地给药。多剂量形式是一系列完全相同的单元剂量形式，其包装于单个容器中，可以以分离的单元剂量形式被施用。多剂量的形式的例子包括小药水瓶、片剂瓶或胶囊瓶或品脱瓶或加仑瓶。因此，多剂量形式是在包装中不隔离开来的单元剂量形式的倍数。

[0382] 除了活性组分例如 sHASEGP 多肽之外，组合物可以含有：稀释剂，诸如乳糖、蔗糖、磷酸氢钙或羧甲基纤维素；润滑剂，诸如硬脂酸镁、硬脂酸钙和滑石；和粘合剂，诸如淀粉、天然胶，例如阿拉伯胶、明胶、葡萄糖、糖蜜、聚乙烯吡咯烷、纤维素和其衍生物，聚维酮、交聚维酮和其他这样的粘合剂，如本领域技术人员所知道的。液体的药学上可施用的组合物可以通过例如将上面定义的活性化合物和可任选的药物佐剂溶解、分散或混合在载体中，从而形成溶液或悬浮液来制备，所述的载体例如水、盐水、含水右旋糖、丙三醇、乙二醇、乙醇和类似物。如果需要的话，待施用的药物组合物也可以含有很小量的无毒辅助物质诸如润湿剂、乳化剂或增溶剂、pH 缓冲剂和类似物，例如醋酸盐、柠檬酸钠、环状糊精衍生物、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、三乙醇胺油酸盐和其他这样的试剂。制备这样的剂型的方法是已知的，或对于本领域技术人员是显而易见的（参见如 Remington's Pharmaceutical Sciences，Mack Publishing Company，Easton，Pa.，15th Edition，1975）。待施用的组合物或制剂含有一定数量的活性化合物，该数量足以改善接受治疗的对象的症状。例如，本文提供的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的标准稳定化制剂包括 EDTA、NaCl 和 $CaCl_2$ 中配制的 150 单位/ml 的可溶性糖蛋白。此外，抗细菌或抗真菌试剂——

包括但不限于硫柳汞——可以存在于制剂中。本文中提供的另一制剂是于 EDTA、NaCl 和 $CaCl_2$ 中的稳定化溶液或冻干形式的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域，其中含有有效活性数量的可溶性糖蛋白，例如 150 单位 /ml，并加入了乳糖，例如 13mg/ml。本文也提供了含有处于 EDTA、NaCl 和 $CaCl_2$ 中的稳定化溶液或冻干形式的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的制剂，其中含有有效活性数量的可溶性糖蛋白，例如 150 单位 /ml，并加入了乳糖，例如 13mg/ml，和白蛋白、Pluronic® F68、TWEEN®和 / 或其他去污剂。本文中提供的另一制剂，或者是冻干的或者是作为稳定溶液，含有有效数量的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域，例如 1 至 300 单位 /ml，它们处于 EDTA、NaCl 和 $CaCl_2$ 中。

[0383] 可以制备含有 0.005％至 100％的活性组分并由非毒性载体来平衡的剂型或组合物。对于口服给药，药物组合物可以采取例如片剂或胶囊的形式，其用药学上可接受的赋形剂，利用常规的方法制备，所述赋形剂例如粘合剂（例如预糊化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填料（例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如硬脂酸镁、滑石或硅石）；崩解剂（例如马铃薯淀粉或羧甲淀粉钠）；或润湿剂（例如月桂基硫酸钠）。片剂可以用本领域已知的方法包被。

[0384] sHASEGPs 或其可溶性人透明质酸酶结构域或药学上可接受的衍生物可以用可保护该可溶性糖蛋白免遭身体的快速清除的载体来制备，例如缓时释放制剂或包衣。组合物可以包括其他药学上具有活性的试剂，所述试剂是该常规领域已知在治疗一种或多种疾病或医学症状中具有价值的试剂，包括但不限于化学治疗剂、止痛剂、抗炎剂、抗微生物剂、抗阿米巴虫剂、抗毛滴虫剂、抗帕金森剂、抗痢疾剂、抗痉挛剂、抗抑郁剂、抗风湿剂、抗真菌剂、抗高血压剂、退热剂、抗寄生虫剂、抗组胺剂、α - 肾上腺素激动剂、α 封阻剂、麻醉剂、支气管扩张剂、杀生物剂、杀菌剂、抑菌剂、β 肾上腺素封阻剂、钙通道封阻剂、心血管药剂、避孕药剂、解充血药剂、利尿剂、镇静剂、诊断试剂、电解质试剂、催眠药剂、激素、促血糖增高药剂、肌松弛剂、肌收缩剂、眼用药剂、拟副交感神经药、心理兴奋剂、镇定剂、拟交感神经药、安定剂、泌尿剂 (urinary agent)、阴道用药剂、杀病毒剂、维生素药剂、非类固醇类抗炎药剂、血管紧张素转化酶抑制剂、多肽、蛋白质、核酸、药物、药物前体、有机分子和促睡眠剂 (sleep inducer)，这样可以获得理想的特性组合。应该理解的是，这样的联合治疗构成了本文中提供的治疗组合物和方法的又一方面。

[0385] 1. 口服组合物

[0386] 口服药物剂型是固体、胶状和液体的。固体剂型是片剂、胶囊、颗粒和整装粉剂。口服片剂的类型包括压缩的、可咀嚼的锭剂和片剂，其可以是肠衣包被的、糖衣包被的或膜包被的。胶囊可以是硬的或软的明胶胶囊，而颗粒和粉末可以与本领域技术人员已知的其它组分联合起来以非泡腾或泡腾的形式提供。

[0387] 含有 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的药物组合物可以是液体形式，例如溶液、糖浆或悬浮液，或可以以在使用之前需要与水或其他合适的载体进行重构的药物产品的方式提供。这样的液体制品可以通过常规的手段用药学上可接受的添加剂来制备，所述的添加剂例如悬浮剂（诸如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪）；乳化剂（诸如卵磷脂或阿拉伯胶）；非水的介质（诸如杏仁油、油酯或分级分离的植物油）；和防腐剂（诸如 p- 羟基苯甲酸甲酯或 p- 羟基苯甲酸丙酯或山梨酸）。

[0388] 在某些实施方案中，制剂是固体剂型形式，优选胶囊或片剂。片剂、药丸、胶囊、药

片和类似物可以含有下述的任何组分或者具有类似性质的化合物：粘合剂；稀释剂；分解剂；润滑剂；助滑剂；甜味剂；和调味剂。

[0389] 粘合剂的例子包括微晶纤维素、黄芪胶、葡萄糖溶液、阿拉伯胶、植物粘胶、明胶溶液、蔗糖和淀粉糊。润滑剂包括滑石、淀粉、硬脂酸镁或硬脂酸钙、石松和硬脂酸。稀释剂包括例如乳糖、蔗糖、淀粉、高岭土、盐、甘露醇和磷酸氢钙。助滑剂包括但不限于胶状二氧化硅。分解剂包括交联羧甲纤维素钠、羧甲淀粉钠、海藻酸、玉米淀粉、马铃薯淀粉、膨润土、甲基纤维素、琼脂和羧甲基纤维素。着色剂包括例如任何被批准的合法的可溶于水的 FD 和 C 染料、其混合物；和悬浮在水化氧化铝上的不溶于水的 FD 和 C 染料。甜味剂包括蔗糖、乳糖、甘露醇和人工甜味剂例如糖精和任何数量的喷干香料 (spray dried flavors)。调味剂包括从植物例如水果提取得到的天然香料，和可产生愉悦感觉的合成的化合物混合物例如但不限于薄荷油和水杨酸甲酯。润湿剂包括丙二醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、二甘醇单月桂酸酯和聚氧乙烯月桂醚 (polyoxyethylene lauralether)。催吐包衣包括脂肪酸、脂肪、蜡、虫漆、氨化虫漆和醋酸邻苯二甲酸纤维素。膜包衣包括羟乙基纤维素、羧甲基纤维素纳、聚乙二醇 4000 和醋酸邻苯二甲酸纤维素。

[0390] 如果希望口服给药，sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域可以以这样的组合物形式提供，即，该组合物可以保护它免遭胃的酸性环境的破坏。例如，该组合物可以配制在肠衣中，该肠衣在胃中维持它的完整性，并在肠中释放出活性化合物。组合物也可以与抗酸剂或其他这样的组分联合起来进行配制。

[0391] 当单元剂型是胶囊时，除了上面类型的物质外，它可以含有液体载体诸如脂肪油。此外，单元剂量形式可以含有各种其他的材料，其修饰该剂量单元的物理形式，例如糖和其他肠内吸收试剂的包衣。化合物也可以作为酏剂、悬浮液、糖浆、干糊片 (wafer)、喷洒剂、口香糖或类似物的组分而被施用。除了活性化合物外，糖浆可以含有蔗糖作为甜味剂，还可以含有某些防腐剂、染料和着色料以及香料。

[0392] sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域也可以与不会削弱期望的作用的其他活性材料混合，或与可以补充期望的作用的材料例如抗酸剂、H_2 封阻剂和利尿剂混合。活性组分是本文中描述的化合物或其药学上可接受的衍生物。可以包括更高浓度的活性组分，最高可达重量的约 98％。

[0393] 包括在片剂中的药学上可接受的载体是粘合剂、润滑剂、稀释剂、分解剂、着色剂、调味剂和润湿剂。肠包衣片剂，由于该肠衣的缘故，可以抵抗胃酸的作用，并在中性和碱性的肠中溶解或分解。糖包被的片剂是压缩片剂，其涂有不同层的药学上可接受的物质。膜包被的片剂是压缩片剂，其已用聚合物或其他合适的包衣包被。多重压缩片剂 (Multiple compressed tablet) 是利用先前提及的药学上可接受的物质通过一个以上的压缩循环制成的压缩片剂。着色剂也可以用于上述剂型。调味剂和甜味剂被用于压缩片剂、糖包被的、多重压缩的和可咀嚼的片剂。调味剂和甜味剂在可咀嚼片剂和锭剂的制备中是特别有用的。

[0394] 液体口服剂型包括含水溶液、乳剂、悬浮液、溶液和 / 或由非泡腾颗粒重构的悬浮液和由泡腾颗粒重构的泡腾制剂。含水溶液包括例如酏剂和糖浆。乳剂是水包油的或油包水的。

[0395] 酏剂是清透的、增甜的氢醇 (hydroalcoholic) 制剂。用于酏剂的药学上可接受的

载体包括溶剂。糖浆是糖例如蔗糖的浓缩水溶液，并可以含有防腐剂。乳状液是两相体系，在其中，一种液体以小球体的形式分散于另一种液体中。用于乳剂的药学上可接受的载体是非水液体、乳化剂和防腐剂。悬浮液使用药学上可接受的悬浮试剂和防腐剂。用于可以被重新配成液体口服剂型的非泡腾颗粒的药学上可接受的物质包括稀释剂、甜味剂和润湿剂。用于可以被重新配成液体口服剂型的泡腾颗粒的药学上可接受的物质包括有机酸和二氧化碳源。着色剂和增味剂被用于上述的所有剂型中。

[0396] 溶剂包括甘油、山梨醇、乙醇和糖浆。防腐剂的例子包括甘油、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、苯甲酸钠和乙醇。用于乳剂的非含水液体的例子包括矿物油和棉籽油。乳化剂的例子包括明胶、阿拉伯胶、黄芪胶、膨润土和表面活性剂诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。悬浮剂包括羧甲基纤维素钠、果胶、黄芪胶、维格姆胶 (Veegum) 和阿拉伯胶。稀释剂包括乳糖和蔗糖。甜味剂包括蔗糖、糖浆、甘油和人造甜味剂诸如糖精。润湿剂包括丙二醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、二甘醇单月桂酸酯和聚氧乙烯月桂醚。有机添加剂包括柠檬酸和酒石酸。二氧化碳源包括碳酸氢钠和碳酸钠。着色剂包括任何批准合法的可溶于水的 FD 和 C 染料以及其混合物。调味剂包括从植物例如水果提取得到的天然风味剂，以及任何可以产生贻人味觉的合成的化合物混合物。

[0397] 对于固体剂型，将处于例如碳酸丙烯酯、植物油或甘油三酯中的溶液或悬浮液封装于明胶胶囊中。这样的溶液、制剂和其封装方法描述于美国专利 4,328,245 ;4,409,239 和 4,410,545 中。对于液体剂型，处于例如聚乙二醇中的溶液可以用足够数量的药学上可接受的液体载体例如水稀释，这可以在施用时被容易地确定。

[0398] 可选择地，液体或半固体制剂可以通过将 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域溶解或分散于植物油、乙二醇、甘油三酯、丙二醇酯（例如碳酸丙烯酯）和其他此类载体中，并将这些溶液或悬浮液封装于硬的或软的明胶胶囊壳中而制备得到。其他有用的制剂包括在美国专利 Re 28,819 和 4,358,603 中所描述的。

[0399] 适用于口腔含化给药（舌下含化给药）的制剂包括例如锭剂，其含有处于有风味的基质 (flavored base) 中的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域，所述的风味基质通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶 ;还例如喉片，其含有处于惰性基质 (inert base) 中的化合物，所述的惰性基质例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶。

[0400] 在所有的实施方案中，片剂和胶囊制剂可以按本领域技术人员所知道的那样进行包被，以便改变或抵抗活性组分的溶解过程。因此，例如，它们可以用常规的肠道可消化包衣——例如水杨酸苯酯、蜡和醋酸邻苯二甲酸纤维素来包被。

[0401] 2. 可注射剂、溶液和乳剂

[0402] 本文也考虑了 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的肠胃外给药，通常以注射为特征，皮下、肌肉内或静脉内给药。可注射剂可以以常规的形式制备，或者作为液体溶液或者作为悬浮液 ;也可以以适于在注射之前用液体溶解或悬浮的固体形式制备 ;或作为乳状液。合适的赋形剂例如水、盐水、右旋糖、丙三醇或乙醇。此外，如果需要的话，待施用的药物组合物也可以含有很小数量的非毒性辅助物质，诸如润湿剂和乳化剂、pH 缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其他试剂诸如例如醋酸钠、失水山梨醇单月桂酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。本文也考虑应用缓慢释放或持续释放的体系，以便维持恒定水平的剂量（参见例如美国专利 3,710,795）。sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域在此类肠胃外组合物中的百

分比取决于其特定性质以及化合物的活性和患者的需要。

[0403] 组合物的肠胃外给药包括皮下和肌肉内给药。用于肠胃外给药的制剂包括用于注射的无菌溶液、无菌干状可溶性产品，诸如冻干的粉末，其仅在使用之前才与溶剂或无菌溶液混合，包括用于皮下注射的片剂、用于注射的无菌悬浮液、仅在使用之前才与媒介物混合的无菌干状不可溶性产品，和无菌乳剂。溶液可以是含水的或者不含水的。

[0404] 如果是静脉内给药，合适的载体包括生理盐水或磷酸缓冲盐水 (PBS)，以及含有增稠剂和增溶剂诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物的溶液。

[0405] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载体包括含水媒介、无水媒介、抗微生物剂、等渗试剂、缓冲液、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、螯合剂或掩蔽剂和其他药学上可接受的物质。

[0406] 含水媒介的例子包括氯化钠注射液、林格注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液、右旋糖和乳酸林格注射液。无水肠胃外媒介包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、香油和花生油。其浓度可以达到抑制细菌或抑制真菌效果的抗微生物剂必须加入到包装于多剂量容器中的肠胃外制剂中，其中包括苯酚或甲酚、水银剂、苯甲醇、三氯丁醇、p- 羟基苯甲酸甲酯和 p- 羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗试剂包括氯化钠和右旋糖。缓冲液包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸利多卡因。悬浮和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯基吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯 80(TWEEN® 80)。金属离子的螯合剂或掩蔽剂包括 EDTA。药物载体也包括用作可与水混溶的媒介的乙醇、聚乙二醇和丙二醇以及用于调节 pH 的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0407] 药物活性化合物的浓度被调节，以便注射液提供可以产生理想药理效果的有效用量。准确的剂量取决于患者或动物的年龄、体重和状态，如本领域所知道的。

[0408] 单元剂量肠胃外制剂被包装于安瓿、小瓶或携带针的注射器中。所有用于肠胃外给药的制剂必须是无菌的，如本领域所已知并实践的。

[0409] 示范性地，含有活性化合物的无菌水溶液的动脉内或静脉内灌输是一种有效的给药方式。另一实施方案是含有为了产生理想的药理效果所必需的活性材料的无菌含水溶液或油溶液或悬浮液。

[0410] 可设计注射剂以用于局部给药和全身性给药。通常，治疗上有效的剂量被配制，相对于接受治疗的组织，其含有浓度至少约 0.1％ w/w 至高达约 90％ w/w，或更多的活性化合物，优选浓度大于 1％ w/w 的活性化合物。活性组分，诸如 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域可以一次给药，或分为许多较小的剂量在间隔的时间里给药。应该理解的是，精确的剂量和治疗的持续时间与正在被治疗的组织有关，并且可以利用已知的测试方案经验性地确定，或由体内或体外测试数据推断得到。应该注意，浓度和剂量值也可以随着接受治疗的个体的年龄而变化。应该进一步理解的是，对于任何特定的患者，具体的给药方案应该依据个体的需要和正在执行或监督制剂给药的人员的专业判断而随着时间的推移进行调整，还应该理解的是，本文中阐述的浓度范围只是示范性的，并不是为了限制要求保护的制剂的范围或实施。

[0411] 本文中提供的化合物可以被配制用来通过注射——例如通过弹丸注射或持续灌输——进行肠胃外给药。用于注射的制剂可以以单元剂量形式存在于例如安瓿中或多剂量

容器中，其中添加有防腐剂。组合物可以是处于油或含水载体中的悬浮液、溶液或乳状液，可以含有配方试剂诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。可选择地，活性组分可以是粉末形式，其在使用之前与合适的介质，例如无菌无热原的水或其他溶剂重新配制。例如，本文所提供的是稳定化溶液或冻干形式的肠胃外制剂，其中含有有效量的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域，例如为 500 至 500,000 单位。

[0412] 化合物可以以微粉化或其他合适的形式悬浮，或可以被衍生化以产生更可溶的活性产物或产生药物前体。所得到的混合物的形式取决于许多因素，包括所打算的给药方式以及化合物在所选择的载体或媒介物中的溶解性。有效的浓度足以改善状况的症状并可以经验性地确定。

[0413] 3. 冻干粉末

[0414] 本文也提供了含有 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的冻干粉末，其可以被再配制为溶液、乳状液和其他混合物而给药。这些制剂也可以被重构和配制为固体或胶。

[0415] 无菌的冻干粉末可以通过将含有 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的实体部分溶解在合适的溶剂中或者将含有 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的溶液的小等份与合适的溶剂相混合而得以制备。所述溶剂可以含有改善该粉末或由该粉末所制备得到的重构溶液的稳定性的赋形剂或其他药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于右旋糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖、乳糖或其他合适的试剂。所述溶剂也可以含有缓冲液，诸如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或其他这样的缓冲液，这是本领域技术人员所知道的，通常为约中性 pH。随后对溶液进行无菌过滤，再在本领域技术人员已知的标准条件下进行冻干，从而得到冻干的制剂。通常，将由无菌过滤获得的溶液分配入小瓶中进行冻干。每个小瓶可以含有单剂量的化合物，诸如 10-1000mg 或 100-500mg，或者含有多倍剂量的化合物。

[0416] 简言之，冻干粉末可以这样来制备，将右旋糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖、乳糖或其他合适的试剂以约 1-20％的量溶解于合适的缓冲液例如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或其它的本领域技术人员所知道的这样的缓冲液中并使 pH 约为中性。然后将所选择的盐例如 sHASEGP 的钠盐（每 10-100gm 的缓冲溶液约 1gm，通常约 1gm/30gms）在室温之上的温度例如约 30-35℃加入到所得到的混合物中，并进行搅拌直到它溶解。所获得的混合物通过加入更多的缓冲液进行稀释，以将所获得的盐浓度降低约 10-50％，通常约 15-25％。所获得的混合物进行无菌过滤或处理，以去除微粒并确保其无菌，并分配入小瓶中用于冻干。冻干的粉末可以在合适的条件下例如在约 4℃至室温进行保存。

[0417] 用注射用水重构该冻干粉末，从而提供了用于肠胃外给药的制剂。为了重构，在每毫升的无菌水或其他合适的载体中，加入治疗上有效数量的含有 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的冻干粉末。精确的数量取决于所选择的化合物，并可以通过本领域技术人员知道的方法经验性地确定。

[0418] 4. 外部给药

[0419] 外用混合物 (topical mixtures) 按照局部和全身性给药中所描述的方法来制备。所得到的混合物可以是溶液、悬浮液、乳剂或类似物，可以配制成乳液、胶、药膏、乳剂、溶液、酏剂、洗液、悬浮液、酊剂、膏、泡沫、气溶胶、灌洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮贴或任何其

他适合于外部给药的制剂。

[0420] sHASEGP 或可溶性人透明质酸酶结构域或其药学上可接受的衍生物的组合物可以配制成气溶胶以用于外部应用，诸如通过吸入方法（参见例如美国专利 4,044,126、4,414,209 和 4,364,923，其描述了用来传送类固醇的气溶胶，所述类固醇可用于治疗炎症疾病，特别是哮喘）。这些呼吸道给药的制剂可以是用于喷雾器的气溶胶或溶液形式，或是作为可吸入的超细粉末，其单独使用或与惰性载体诸如乳糖联合使用。在这样的情况下，制剂的颗粒通常具有小于 50 微米的直径，例如小于 10 微米。

[0421] 对于吸入给药，本文使用的组合物可以以气溶胶喷雾给药的形式从加压的包装或喷雾器中传送出来，其中使用合适的推进剂，包括但不限于二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳和其他合适的气体。在加压气溶胶的情况中，单元剂量可以通过提供阀来传送计量数量 (metered amount) 的气溶胶来确定。用于吸气器或吹药器的——例如明胶的——胶囊和弹筒可以配制成含有所述的化合物的粉末混合物和合适的粉末基质诸如乳糖或淀粉。

[0422] 组合物可以被配制用于局部或外部应用，例如以凝胶、乳液和洗液的形式外部应用于皮肤和粘膜诸如眼睛里，或应用于眼睛或用于脑池内或椎管内应用。外部给药也被考虑用于透皮传送，以及用于眼给药或粘膜给药，或用于吸入治疗。单独的活性化合物的鼻部给药溶液或与其他药学上可接受的赋形剂相联合的活性化合物的鼻部给药溶液也可以被施用。

[0423] 例如，适合于外部应用于皮肤或眼的制剂通常配制为药膏、乳液、洗液、糊、凝胶、喷雾剂、气溶胶和油。可以使用的载体包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、乙醇和其两种或更多种物质的组合。外用制剂还可以有利地含有重量比例为 0.05％至 15％的增稠剂，包括但不限于 :羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚（亚烷基乙二醇）、聚羟烷基、(meth) 丙烯酸酯或聚 (meth) 丙烯酰胺。外用制剂常常通过滴注或作为进入结膜囊的药膏来应用。也可以用于眼、面窦 (facial sinuses) 和外耳道的灌洗或润滑。液体状的外用制剂也可以存在于亲水性的三维聚合物基质中，例如作为条带 (strip)、隐形眼镜和类似物的形式，从中可以释放出活性组分。也可以注射入眼睛前房和其他地方。例如，本文提供了在注射粘弹性试剂之后于眼内应用的制剂，其含有有效数量的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域的稳定化溶液，例如含有 1 至 5000 单位的可溶性糖蛋白，它们具有 30 至 150,000 单位 /mg 的比活性，所述溶液的体积是小量的，例如 5 至 50μl。

[0424] 这些溶液，特别是那些眼用的溶液，可以用合适的盐配制成 0.01％ -10％等渗溶液，pH 约 5-7。

[0425] 用于其他给药途径的组合物

[0426] 其他的给药途径，诸如外部给药，透皮膏贴以及直肠给药也在本文考虑之中。

[0427] 例如，直肠给药的药物剂型是产生全身性效果的直肠栓剂、胶囊和片剂。本文中所使用的直肠栓剂是指用于插入到直肠中的固体，其在体温下融解或软化，释放出一种或多种药理学上或治疗上具有活性的成分。在直肠栓剂中被利用的药学上可接受的物质是基质 (bases) 或介质和可以提高熔点的试剂。基质的例子包括可可油、甘油 - 明胶、碳蜡（聚氧乙二醇）和合适的脂肪酸的甘油单酯、甘油双酯和甘油三酯的混合物。可以使用各种基质的组合。提高栓剂熔点的试剂包括鲸油和蜡。直肠栓剂可以通过压缩方法或通过铸型方法

来制备。直肠栓剂一般重量为约 2 至 3gm。

[0428] 用于直肠给药的片剂和胶囊可以使用同样的药学上可接受的物质并采用与制备口服给药制剂相同的方法来制造。

[0429] 适用于透皮给药的制剂可以是独立的膏贴，其适于在延长的时间段内与接受者的表皮保持紧密接触。此种膏贴适当地含有活性化合物，对于该活性化合物，可相当于浓度为例如 0.1 至 0.2M 的可任选地缓冲的水溶液。适合于透皮给药的制剂也可以用离子电渗疗法传送（参见例如 Pharmaceutical Research 3(6) :318(1986)），并且通常采用活性化合物的可任选地缓冲的含水溶液的形式。

[0430] 药物组合物也可以通过可控释放手段和 / 或传送装置来给药（参见例如美国专利 3,536,809 ;3,598,123 ;3,630,200 ;3,845,770 ;3,847,770 ;3,916,899 ;4,008,719 ;4,687,610 ;4,769,027 ;5,059,595 ;5,073,543 ;5,120,548 ;5,354,566 ;5,591,767 ;5,639,476 ;5,674,533 和 5,733,566）。活性化合物或药学上可接受的衍生物可以用可保护化合物免被身体迅速清除的载体来制备，例如定时释放的制剂或包衣。

[0431] 在本文提供的组合物和方法的一种实施方案中，治疗剂通过缓慢释放传送媒介物局部地施用，例如，将治疗剂封装于胶体分散体系中或聚合物稳定化晶体中。有用的胶体分散体系包括纳米胶囊、微球体、珠子和基于脂的体系，包括水包油乳剂、微胞、混合微胞和脂质体。例如，胶体分散体系可以是脂质体或微球体。脂质体是人造膜载剂，当被注射或植入时可用作缓慢释放传送介质。脂类聚合物共轭物和脂质体的一些例子公开于美国专利 5,631,018 中，其通过引用方式整体并入本文中。缓慢释放传送介质的其他例子是生物可降解的水凝胶基质（美国专利 5,041,292）、树枝状聚合物共轭物（美国专利 5,714,166）和脂质体多囊颗粒 (Depofoams ® Depotech，San Diego，CA)（美国专利 5,723,147 和 5,766,627）。适用于封装治疗剂以用于局部注射（例如注射入皮下组织）的一类微球体是聚 (D，L) 交酯微球体，其描述于 D.Fletcher，Anesth.Analg.84 :90-94，(1997) 中。例如，含有有效量的 sHASEGP 或其可溶性人透明质酸酶结构域——例如 1 至 5000 单位 /ml——的缓慢释放制剂可以用于各种用途或用于治疗各种症状，包括但不限于整容制剂和治疗脊髓损伤。

[0432] 理想的血液水平可以通过持续输入活性试剂来维持，通过血浆水平进行确证。应该注意的是，主治医生将知道依据毒性或者骨髓、肝脏或肾功能紊乱的情况，如何以及何时停止、中断或调整治疗，以降低剂量。反过来，如果临床反应不足（排除毒性副作用），主治医生也知道如何以及何时将治疗调到更高的水平。

[0433] sHASEGP 多肽和 / 或它的抑制剂——单独或与其他试剂例如治疗活性试剂的联合——的效用和 / 或毒性也可以通过本领域已知的方法来评估（参见例如 O &Apos ;Reilly，Investigational New Drugs 15 :5-13(1997)）。

[0434] 6. 制造产品

[0435] SHASEGP 多肽或其可溶性人透明质酸酶结构域或含有任何前述试剂的组合物可以包装为制造产品，其中含有包装材料、在包装材料内的本文中提供的化合物或其合适的衍生物——它们可以有效地治疗本文所考虑的疾病或紊乱、标明所述化合物或其合适的衍生物是用于治疗本文所考虑的疾病或紊乱的标签。该标签可以任选地包括被证明可以治疗的紊乱。

[0436] 本文提供的制造产品包含包装材料。用于包装药物产品的包装材料是本领域技术人员熟知的（参见例如美国专利5,323,907、5,052,558和5,033,352）。药物包装材料的例子包括但不限于硬质泡沫塑料包装、瓶、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器和任何适用于所选择的制剂和所打算的给药和治疗方式的任何包装材料。本文所提供的化合物和组合物的多种制剂被考虑，用于为任意的紊乱提供多样的治疗，在所述的紊乱中，HCV感染涉及作为症状或病因的介导物或原因所在。

[0437] 本文也提供了含有组合物和/或与其给药说明书的组合的试剂盒。试剂盒还可以包括通常以无菌形式包装的用于注射复合物的针或注射器，和/或包装好的酒精片。说明书也可以任选地包含在其中，以指导临床医生或患者使用活性试剂。例如，本文提供了这样的试剂盒，其含有小体积的注射器，连带有有效数量的sHASEGP或其可溶性人透明质酸酶结构域，例如1至5000单位的可溶性糖蛋白，体积为5至50μl，可任选地含有包含粘弹性试剂的第二个注射器。本文也提供了这样的试剂盒，其含有小体积的注射器，其中含有有效数量的sHASEGP或其可溶性人透明质酸酶结构域，例如1至5000单位的可溶性糖蛋白，以及治疗量的另一活性组分，诸如药物、小分子、蛋白或核酸。

[0438] K. 动物模型

[0439] 本文提供了转基因动物模型和动物，诸如啮齿类动物包括小鼠和大鼠、牛、鸡、猪、山羊、绵羊、猴类包括大猩猩和其他灵长类。特别地，提供了转基因非人动物，其含有编码sHASEGP多肽的异源核酸，或提供了这样的转基因动物，在其中，所述多肽的表达已被改变，例如通过置换或修饰内源基因的启动子区域或其他调控区域。此类动物可以通过促进内源性核酸和外源性sHASEGP基因之间通过同源性或其它重组事件而发生的重组来产生，其中，所述外源性sHASEGP基因可以被过量表达或不当地表达，例如通过在强启动子下进行表达。

[0440] 转基因动物可以通过使用任何已知的传送方法将核酸导入种系细胞或体细胞例如胚胎干细胞而产生，所述的传送方法包括但不限于微注射、脂转染和其他基因传送方式。通常将核酸导入细胞例如胚胎干细胞(ES)中，然后将该ES细胞注射入胚球，并将胚球植入代孕母亲，再产生转基因动物。通常，异源的sHASEGP编码核酸和内源性核酸之间的重组将异源核酸分子整合入动物染色体。异源核酸可以靶向特定的染色体。在一些例子中，可以产生基因敲除动物。此类动物可以首先通过促进它的染色体中的sHASEGP多肽基因和生物学上失活的外源性sHASEGP多肽基因（通常，通过插入异源序列例如抗生素抗性基因来实现）之间的同源重组而产生。在一种实施方案中，这种同源重组通过用含有插入失活的sHASEGP多肽基因的载体转化胚胎衍生的干细胞来实施，这样，发生同源重组，然后将ES细胞注射入胚球，并将胚球植入代孕母体，由此产生嵌合动物（“基因敲除动物”），在其中，sHASEGP多肽基因已失活（参见Capecchi,Science 244:1288-1292(1989)）。可以培育该嵌合动物，以产生纯合的基因敲除动物，其然后可以被用来产生额外的基因敲除动物。基因敲除动物包括但不限于小鼠、仓鼠、羊、猪、牛和其他非人动物。例如，产生基因敲除小鼠。所得到的动物可以充当特定疾病例如癌症的模型，其显示出不足的sHASEGP多肽表达水平。这样的基因敲除动物可以用作此类疾病的动物模型，它们可以例如用来筛选或测试能够治疗或预防此类疾病或紊乱的分子。

[0441] 其他类型的转基因动物也能被产生，包括过量表达sHASEGP多肽的转基因动物。

这样的动物包括“基因敲入 (knock-in)”动物，这里是指这样的动物，它的正常基因被变体例如突变体——可造成过量表达的形式或其他形式——所替代。例如，一个物种例如啮齿类动物的内源性基因用其他物种例如人的基因替代。动物也可以通过非同源重组进入染色体中的其他位点而产生；包括发生过一系列整合事件的动物。

[0442] 在产生第一代转基因动物之后，可以对嵌合动物进行育种，以产生额外的动物，这些动物产生过量表达的或不当表达的 sHASEGP 多肽。这样的动物包括但不限于小鼠、仓鼠、羊、猪、牛和其他非人哺乳动物。所得到的动物可以充当特定疾病例如癌症的模型，其显示出 sHASEGP 多肽的过量表达或不当表达。这样的动物可以用作此类疾病的动物模型，例如用来筛选或测试能够治疗或预防此类疾病或紊乱的分子。在特定的实施方案中，产生具有过量表达的或不当表达的 sHASEGP 多肽的小鼠。

[0443] 下面的实施例只是用于示范的目的，而不是为了限制本发明的范围。

[0444] L. sHASEGP 的治疗用途

[0445] 在过去的 40 年里，来自屠宰物的天然发生的透明质酸酶已经成为临床酶制剂的重要来源。牛和羊睾丸是这种材料的主要来源。然而，这种临床酶制剂是非常粗糙的，被售的制剂的纯度在 0.5-5％范围内，已知的比活性为 30-100,000 单位 /mg 之间。因此，它们纯度的缺乏以及它们的屠宰场来源使得它们不但成为人的免疫源而且成为克 - 雅二氏症 (Jacob Creutzfeld) 和其他牛和羊病原体的潜在来源。已经知道发生过对牛和羊透明质酸酶制剂的过敏反应。

[0446] 牛或细菌来源的透明质酸酶已经被用于治疗与过量透明质酸有关的疾病，还被用来增强生理流体和 / 和治疗剂的循环。例如，牛透明质酸酶可以与球周、球后和 sub-Tenon′ s 麻醉阻断剂一起注入，用于眼科手术程序。而且，在缺乏透明质酸酶时手术并发症也出现增加 (Brown SM et al. J Cataract Refract Surg. 1999 Sep ;25(9) : 1245-9.)。牛透明质酸酶也可以用作局部坏死 (local necrosis) 的解毒剂，该局部坏死来自于致坏死物质例如长春花植物碱的静脉旁注射 (Few, B. J. (1987) Amer. J, Matern. Child Nurs. 12, 23-26)。牛睾丸透明质酸酶也可用于治疗神经节囊肿 (Paulet al. J Hand Surg 1997 Apr ;22(2) :219-21)。透明质酸酶也可以用来帮助流体在皮下灌注术中的皮下传送 (Berger EY, Am Geriatr Soc 1984 Mar ;32(3) :199-203)。透明质酸酶也已被用于降低接受粘弹性物质的青光眼患者和白内障患者眼睛内的眼内压（美国专利 4,820,516, 1989 年 4 月 11 日）。

[0447] 牛或细菌来源的透明质酸酶已被用作“扩散剂”，来增强化学治疗剂的活性和 / 或使得肿瘤能更容易接近化学治疗剂 (Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32 :173, abstract no. 1034 ;Czejka et al., 1990, Pharmazie 45 :H. 9)。化学治疗和透明质酸酶的联合在治疗各种癌症中是有效的，所述癌症包括膀胱癌 (Hornet al., 1985, J. Surg. Oncol. 28 :304-307)、鳞状细胞癌 (Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120 : 293-297)、乳腺癌 (Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118 :591-596)，和肠胃癌 (Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8 :391-396)。透明质酸酶作为治疗脑癌（神经胶质瘤）的唯一治疗剂是很有效的 (PCT 公开申请号 WO88/02261, 1988 年 4 月 7 日公布)。透明质酸酶的给药也诱导胰腺、胃、结肠、卵巢和乳房的以前对化学治疗具有抵抗性的肿瘤发生应答 (Baumgartner et al., 1988, Reg. Cancer Treat. 1 :55-58 ;Zanker et

al.,1986,Proc.Amer.Assoc.Cancer Res.27:390)。不幸的是,污染物和此类透明质酸酶的非人属性会产生过敏反应。

[0448] 除了它的间接的抗肿瘤效应外,牛来源的透明质酸酶具有直接的抗癌效应。透明质酸酶预防移植入小鼠的肿瘤的生长(De Maeyer et al.,1992,Int.J.Cancer 51:657-660),抑制在暴露于致癌物质时肿瘤的形成(Pawlowski et al.,1979,Int.J.Cancer23:105-109;Haberman et al.,1981,Proceedings of the 17th Annual Meeting of theAmerican Society of Clinical Oncology,Washington,D.C.,22:105,abstract no.415)。

[0449] 考虑到牛来源的透明质酸酶作为治疗剂的价值,特别是在与传统的化疗剂一起用于化学治疗时的价值,或者它单独作为化学治疗的治疗剂时的价值,就存在着对基本上纯的人来源的透明质酸酶制剂的需求。也需要用有效率的、具成本效益的方法来制备透明质酸酶,以提供商业上显著数量的酶。本发明便解决了这些问题。

[0450] 透明质酸是胞外基质的重要成分。透明质酸发现于哺乳动物的结缔组织中,是眼玻璃体的主要构成成分。在结缔组织中,与透明质酸相关的水合的水在组织之间创造出空间,从而产生有利于细胞运动和增殖的环境。透明质酸在与细胞运动相关的生物学现象中起到关键作用,包括快速发育、再生、修复、胚胎发生、胚胎发育、伤口愈合、血管生成和肿瘤发生(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)。此外,透明质酸水平与肿瘤侵入相关(Ozello et al.,1960,Cancer Res.20:600-604;Takeuchi et al.,1976,CancerRes.36:2133-2139;Kimata et al.,1983,Cancer Res.43:1347-1354)。

[0451] 脊髓损伤之后,神经胶质瘢痕由星形细胞产生,并含有硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPGs)。CSPGs在轴突生长的抑制中发挥关键作用(Levine,1994;Powell et al.,1997)。例如,在胚胎发育期间,CSPGs压迫轴突并抑制神经细胞粘着。CSPGs也在边界形成(boundary formation)中发挥重要作用(Snow et al.,1990,1992;Powelland Geller,1999)。此外,在CNS损伤之后CSPG的表达增加(Mckeon et al.,1991;Davies et al.,1997)。

[0452] 研究表明,CSPGs的抑制作用主要是由硫酸软骨素(CS)糖胺聚糖(GAG)糖链引起的(Snow et al.,1990;Cole and McCable,1991;Geisert and Bidanset,1993)。这得到了下面的发现的支持,即,细菌软骨素酶的鞘内给药事实上促进了轴突再生。而且,电生理学实验证明,再生的CST轴突建立功能联系(Bradbury,et al 2002)。除了CSPGs的直接抑制效果之外,CSPGs也可以与细胞粘附分子或神经营养因子相互作用,来影响神经突的生长(Roberts et al.,1988;Ruoslahti and Yamaguchi,1991;Milev et al.,1994)。重组的哺乳动物透明质酸酶因此可以用于逆转CSPG在神经胶质瘢痕中的抑制作用以及促进损伤之后的轴突再生。

[0453] 充分降解神经胶质瘢痕中的CSPG所需的sHASEGP的数量将会变化。在一些情况下,通过鞘内传送反复地给予10-5000单位的sHASEGP将是去除瘢痕内的CSPG所必需的。在其他情况下,优选通过使用缓慢释放制剂持续释放sHASEGP。可选择地,给予编码sHASEGP的基因治疗载体可以有效地增强CSPG的清除。

[0454] sHASEGPs也可以在称为化学髓核溶解术的方法中被用来治疗椎间盘突出。软骨素酶ABC和切割类似底物的酶例如sHASEG能诱导降低腰脊椎中的椎间盘内压力(Sasaki et al.,2001,Ishikawa et al.,1999)。有三类椎间盘损伤。伸出的椎间盘(protruded disk)是完整但是凸出的一种类型。在挤出的椎间盘(extruded disk)中,纤维质包裹物(fibrous wrapper)被撕裂,NP泄出,但依然与椎间盘相联。在分离的椎间盘(sequestered disk)中,NP的片段从椎间盘脱开,并游离于脊髓。化学髓核溶解术对于伸出的椎间盘和挤出的椎间盘是有效的,但对于分离的椎间盘损伤没有效果。在美国,化学髓核溶解术仅被批准用于腰部(更低的)脊椎。在其他国家,它已经被成功地用于治疗颈(上部脊椎)突出。因此,当优选要降低椎间盘压力时,化学髓核溶解术是椎间盘手术的保守性替代方案。

[0455] 糖蛋白上的碳水化合物链的精确组成和结构能直接影响它的血清寿命,这是因为肝脏和网状内皮系统中的细胞能够结合携带特定碳水化合物的循环糖蛋白并使之内在化。肝细胞在它们的表面上具有受体,这些受体识别具有末端(即,聚糖相对于多肽的最远端)Gal残基的寡糖链,巨噬细胞含有识别末端Man或GlcNAc残基的受体,肝细胞和淋巴细胞具有识别暴露的海藻糖残基的受体。然而,还没有发现唾液酸特异性受体。尽管与寡糖的空间排布有些许关系,但按照一般规则来说,被肝脏和网状内皮系统中的细胞表面受体识别的暴露糖残基的数量越多,糖蛋白被清除出血清的速度越快。然而,因为不存在唾液酸特异性受体,所有分支由唾液酸来末端化或“加帽”的寡糖不会加快与之连接的蛋白质的清除。

[0456] 除了影响它被肝脏和网状内皮的细胞中的糖特异性受体识别之外,糖蛋白上寡糖链的存在和性质也能影响重要的生物化学特性。将碳水化合物从糖蛋白去除通常将降低它的溶解性,并且它也可以通过将正确的多肽折叠形式去稳定化和/或暴露蛋白酶敏感性位点,而使得它更易遭受蛋白水解的降解作用。由于类似的原因,蛋白质中的糖基化状况能够影响免疫系统对它的识别。

[0457] 在冷冻保藏和其他体外受精技术例如细胞质内精子注射(ICSI)之前,sHASEGPs可以被用来去除卵周围的卵丘细胞。在缓冲盐溶液中,可以将10-200U/ml之间的透明质酸酶加入到收集的卵母细胞中。通过吹吸和用缺少透明质酸酶的介质进行数次的洗涤,将卵母细胞与释放的卵丘细胞分离开来。然后可以对卵进行处理,以用于冷冻保藏或IVF技术。

[0458] sHASEGPs也可以用于使化学治疗剂更有效地渗入实体肿瘤中。sHASEGPs可以与抗癌症试剂一起进行肿瘤内注射,或者对于弥散性癌症或难以到达的肿瘤,可以静脉内注射。抗癌症剂可以是化学治疗剂、抗体、肽或基因治疗载体、病毒或DNA。此外,sHASEGP可以被用来将肿瘤细胞招募至循环库(cycling pool),以对具有获得性多元药物抗性的化学治疗难以对付的肿瘤进行增敏作用(St Croixet al Cancer Lett 1998 Sep 11;131(1):5-44)。sHASEGPs也可以用于帮助生物制剂例如单克隆抗体、细胞因子和其他药物传送到积聚糖胺聚糖的肿瘤中。许多肿瘤剔除了参与糖胺聚糖的分解代谢的基因,这样局部的积聚可以阻止抗肿瘤试剂和免疫系统到达肿瘤块。

[0459] sHASEGP也可以用于增加对常规的化学治疗有抗性的肿瘤的敏感性。在一种实施方案中,将sHASEGP施用于带有与LuCa-1缺陷相关的肿瘤的患者,施用量足以增加在肿瘤位点周围的扩散(例如,增加化学治疗因子的循环;例如,促进化学治疗试剂在肿瘤位点和肿瘤位点周围的循环和/或浓缩)、抑制肿瘤细胞运动性(例如,通过HA降解),和/或降低肿瘤细胞凋亡阈值(即,将肿瘤细胞带入失巢凋亡状态),该状态使得肿瘤细胞更易遭受

化学治疗试剂或其他可促进细胞死亡的试剂的作用，优选选择性地促进细胞以失巢凋亡的形式发生程序性细胞死亡。本文中使用的化学治疗剂旨在包括所有分子，合成的（例如，顺铂）以及天然发生的（例如，肿瘤坏死因子 IF)），它们帮助抑制肿瘤细胞生长，优选地促进——更优选地选择性促进——肿瘤细胞死亡。

[0460] 特别有价值的是，使用 sHASEGP 来治疗转移性和非转移性癌症，特别是转移性癌症，它们相对于非癌症（正常）细胞，具有已经降至不能被检测的透明质酸酶活性。sHASEGP 可以用作化学治疗剂（单独或与其他化学治疗剂联合），可以用于治疗许多不同的癌症，特别是入侵性肿瘤。例如，sHASEGP 可以被用来治疗肺小细胞癌、肺鳞状细胞癌以及胸、卵巢、头和颈癌症，或任何其他与降低的透明质酸酶水平相关的癌症，或与缺陷型 LuCa-1(hpHAse) 基因（例如，不能表达足够水平的 hpHAse 的 LuCa-1 基因，或编码不能提供足够水平的透明质酸酶活性的缺陷 hpHAse 的 LuCa-1 基因）相关的癌症，或任何其他与降低的透明质酸分解代谢相关的缺陷。sHASEGP 优选用于治疗与 HA 分解代谢缺陷相关的恶性病，它不需要细胞来参与降解作用。

[0461] 适于施用的具体剂量可以由本领域普通技术人员根据上面讨论的因素容易地确定（参见例如 Harrison′ s Principles of Internal Medicine,1 1th Ed.,1987)。此外，人中的合适剂量的估计可以通过 sHASEGP 在体外的酶活性水平的测定和 / 或在动物研究中的有效剂量来进行推断。例如，70-300TRU 的透明质酸酶能有效地减少鼠中的肿瘤负荷。考虑到该信息，在人中的对应剂量的范围为平均 70kg 体重中约 250,000-1,200,000TRU 透明质酸酶。给予人类患者的 sHASEGP 的数量通常在 1TRU 至 5,000,000TRU 的酶活性的范围内，优选在约 1,000TRU 至 2,500,000TRU 的范围内，更优选在约 100,000TRU 至 1,500,000TRU 的范围内，正常情况下在约 250,000TRU 和 1,200,000TRU 之间，约 725,000TRU 的剂量代表了平均处方剂量。

[0462] 在一种实施方案中，sHASEGP 配制于 0.15M 盐溶液中，其中含有浓度约 150,000TRU/cc 的 sHASEGP。然后将制剂以 15,000TRU/kg 患者体重的量静脉内注射。可选择地，该酶制剂也可以皮下注射，以使得透明质酸酶可以灌注至肿瘤位点的周围。在优选的实施方案中，将 HASEGP 在肿瘤周围注射，或者注射入肿瘤块。在另一优选的实施方案中，sHASEGP 配制成脂质体，通过静脉内注射而被传送，或者，通过在与 LuCa-1(hpHAse) 基因的缺陷相关的癌细胞的位点处或其附近进行注射而被传送。SHASEGP 的静脉内注射导致在肿瘤位点中具有 sHASEGP。而且，因为 sHASEGP 上的末端唾液酸防止该酶被网状内皮系统从循环中清除掉，所以超唾液酸化的 sHASEGP 对于肠胃外给药是优选的。超唾液酸化的 sHASEGP 与非唾液酸化的牛和羊透明质酸酶的比较显示，其具有更加有利的药物动力学。

[0463] 基因治疗的易化

[0464] 大部分的基因传送媒介物的体内效率并不与在体外所观察到的效率相对应。糖胺聚糖能阻碍 DNA 和病毒载体转移和扩散入许多细胞类型中。这样的胞外基质材料的水平能大大地阻碍该过程。Dubensky et al.,(Proc Natl Acad Sci U S A1984 Dec ;81(23) : 7529-33) 证明，当与胶原酶联合时，透明质酸酶可帮助 DNA 的体内转导。已经证明，腺相关病毒也能胜任透明质酸酶介导的基因治疗 (Favre et al, Gene Ther 2000 Aug ;7(16) : 1417-20)。

[0465] 我们已经在本文中证明，在胞外基质中具有确定尺寸的通道用 sHASEGP 打开。这

些孔没有增加直径大于约 200-500nm 的物质的扩散。然而，更小的分子诸如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和 DNA 复合物可发生由 sHASEGP 介导的扩散。

[0466] 可选择地，病毒也可以装配有 sHASEGP 基因，以方便它们在靶组织中复制和传播。靶组织可以是癌症组织，因此，病毒能够在肿瘤内选择性地复制。病毒也可以是非裂解性病毒，其中，病毒在组织特异性启动子下选择性地复制。随着病毒的复制，sHASEGP 与病毒基因的共表达将促进病毒在体内的传播。

[0467] 可选择地，感兴趣的核酸和 sHASEGP 可以同时使用，或连续使用或错开时间使用。同时使用是指同时给药。在这种情况下，这两种主要成分可以在给药之前混合成组合物，或者可以同时给予细胞或宿主生物体。也可以连续给药，也就是说相继给药，不论本发明的联合产品中的哪种成分先被给予。最后，可以使用这样的给药方式，即，错开时间给予，或者间断给予，其停止又再重新开始，可以是有规律和无规律的。应该指出的是，两种成分的给药途径和位点可以是不同的。根据一种特别优选的实施方案，sHASEGP 在所述核酸之前给予，而这两种成分的给药途径优选是相似的。注射之间的时间间隔不是关键的，可以由技术人员来确定。可以推荐 10min 至 72h 的时间间隔，有利地为 30min 至 48h 的时间间隔，优选 1 至 24h 的时间间隔，非常优选地，为 1 至 6h 的时间间隔。

[0468] 此外，本发明的联合产品也可以与一种或多种旨在改善核酸给药的分子相联合。所述分子可以是这样的分子，其对核酸具有保护性作用（防止其在细胞内降解）、其改善它对宿主细胞的渗透或它在宿主细胞中的表达（促融合肽、核定位信号等）、其使得能够靶向特定的细胞类型（识别细胞表面蛋白质的配体或抗体，等），或其延长治疗效应（免疫抑制试剂，等）。所述的联合产品也可以与促进转染的试剂（蛋白质等）联合。

[0469] 本发明的联合产品可以以局部或肠胃外给药为目的或以通过消化途径给药为目的进行制备。本文中特别提到的途径是胃内、皮下、心脏内、静脉内、腹腔内、滑液内、肿瘤内、肺内、鼻内和气管内途径，并且更特别地，是肌肉内途径。给药可以通过本领域的任何技术（注射、口服途径、气溶胶、灌输等）来实现，可以作为单一剂量或作为在特定的时间间隔之后再重复一次或若干次的剂量。给药途径可以进行调整以适应被转染的感兴趣的基因和被治疗的疾病。制剂可以包括药学上可接受的介质（赋形剂、辅助剂等）。导致胞外基质解体的物质和感兴趣的核酸优选溶解于缓冲液中，该缓冲液适合用于药物用途且可以是高渗性的、低渗性的或等渗性的。可以考虑各种缓冲液。可以列举出的缓冲液有生理盐溶液 (0.9％ NaCl)、非生理盐溶液 (1.8％ NaCl)、Hepes-Ringer 溶液、乳酸盐 -Ringer 溶液，基于 Tris-HCl(10mM Tris-HCl，pH 7.5 至 8、1mM EDTA；10mM Tris-HCl，pH 7.5 至 8、1mM $MgCl_2$) 的缓冲液、磷酸缓冲液（克雷布斯磷酸盐 H_2O 缓冲液）、糖（葡萄糖、蔗糖、海藻糖等）溶液或仅仅是水。

[0470] 皮下灌注术

[0471] 皮下灌注术，流体的皮下灌输，是有用和方便易行的水合作用技术，适合于轻微至中等程度失水的成年患者，尤其是老年患者。该方法被认为是安全的，且不会造成任何严重的并发症。最常见的不利影响是轻微的皮下浮肿，这可以通过局部按摩和全身性利尿剂而得以处理。可以在 24 小时内在两个不同的位置给予大约 3L。常用的灌输位置是胸腔、腹、大腿和上肢。优选的溶液是生理盐水，但可以使用其他溶液，例如半生理盐水，盐水葡萄糖或 5％葡萄糖。如果需要的话，可以将氯化钾加入到溶液袋中。此外，其他药物可以通过类

似的途径传送。可以加入人 sHASEGP，以增强流体吸收和增加给药的总速度。因为它不可能具有如同牛的酶所知道的那样的免疫原性，所以相对于屠宰场来源的酶来说，人 sHASEGP 是优选用于反复的皮下灌注术的。

[0472] 在非卧床患者中，皮下灌注术的位点包括腹、上胸腔、乳房以上、肋间隙和肩胛区。在卧床患者中，优选的位点是大腿、腹部和上肢外侧。1 至 4 天后，应该更换针和导管，尽管灌输装置曾经被使用更长的时间而无并发症出现。可以 1 天 3 次，一次 1 或 2 小时，给予 500mL 的用量，在第一次的早上输注之前于皮下位点给予 150U 的 sHASEGP。

[0473] 治疗性注射的易化

[0474] 许多经皮注射的分子缓慢地或以非常缓慢的效率进入循环。若干因素调控皮下注射 (SC) 或肌内注射 (IM) 的分子的药动学和药效学。通常，更大的分子以更缓慢的速度和更低的效率进入循环，它们不是通过主动运输进入循环的。皮下生物利用度，是通过计算 SC 与静脉内注射时的曲线下面积的比率 (AUCsc/AUC 静脉内) 来确定的。另一因素是基质分子的电荷和亲合性，它们在分子在皮下的扣留过程中发挥重要的作用。如果这些材料在局部便被降解，它们可能从未到达它们的期望靶标，并因而对靶器官而言表现出降低的全身性总生物利用度。

[0475] 大的蛋白通常是静脉内给药，因此药剂在血流中直接被利用。然而，如果药剂可以皮下给药、肌内给药或皮内给药的话，这会是有利的，这是因为这些给药形式对患者来说更容易操作。尤其是，当药剂必需在一生中有规律地施用时，以及治疗很早就开始，当患者是儿童时就开始治疗时。然而，具有非常大的和不稳定的分子例如 170 至 300kDa 的凝结因子 VIII 的药剂，如果被皮下、肌内给药或皮内给药的话，则通常具有非常低的生物利用度，这是因为吸收不足并且降解严重。

[0476] 除了需要增加许多皮下给药的生物制剂的生物利用度之外，更快速的药物动力学在急诊的情况下也是至关重要的。当全身性地给药时，对于许多患者而言，接通静脉内通路所需要的时间阻止了本应快速作用的药物被利用。在一些情况下，在不能接通静脉内通路之后，再进行皮下注射，这进一步延长了到达靶器官的时间。因此，皮下注射的药物的更迅速的可利用性，将是有利的，这样可实现第一线的治疗，而不会由于接通静脉所需要的时间而冒险。可以皮下传送以及静脉内传送的分子的例子包括肾上腺素、阿托品、纳洛酮 (narcan)、利多卡因和右旋糖。

[0477] 许多经皮注射的分子缓慢地或以非常缓慢的效率进入循环。若干因素调控皮下注射 (SC) 或肌内注射 (IM) 的分子的药动学和药效学。通常，更大的分子以更缓慢的速度和更低的效率进入循环，它们不是通过主动运输进入循环的。皮下生物利用度，是通过计算 SC 与静脉内注射时的曲线下面积的比率 ($AUCsc/AUC_{静脉内}$) 来确定的。另一因素是基质分子的电荷和亲合性，它们在分子在皮下的扣留过程中发挥重要的作用。如果这些材料在局部便被降解，它们可能从未到达它们的期望靶标，并因而对靶器官而言表现出降低的全身性总生物利用度。

[0478] 大的蛋白通常是静脉内给药，因此药剂在血流中直接被利用。然而，如果药剂可以皮下给药、肌内给药或皮内给药的话，这会是有利的，这是因为这些给药形式对患者来说更容易操作。尤其是，当药剂必需在一生中有规律地施用时，以及治疗很早就开始，当患者是儿童时就开始治疗时。然而，具有非常大的和不稳定的分子例如 170 至 300kDa 的凝结因子

VIII 的药剂，如果被皮下、肌内给药或皮内给药的话，则通常具有非常低的生物利用度，这是因为吸收不足并且降解严重。

[0479] 除了需要增加许多皮下给药的生物制剂的生物利用度之外，更快速的药物动力学在急诊的情况下也是至关重要的。当全身性地给药时，对于许多患者而言，接通静脉内通路所需要的时间阻止了本应快速作用的药物被利用。在一些情况下，在不能接通静脉内通路之后，再进行皮下注射，这进一步延长了到达靶器官的时间。因此，皮下注射的药物的更迅速的可利用性，将是有利的，这样可实现第一线的治疗，而不会由于接通静脉所需要的时间而冒险。可以皮下传送以及静脉内传送的分子的例子包括肾上腺素、阿托品、纳洛酮(narcan)、利多卡因和右旋糖。

[0480] 本发明的另一优点在于，能够以 SC 或 IM 的方式传送相等体积或更大体积的溶液，而不存在与在注射位点处的溶液压力或体积相关的疼痛和病态。

[0481] 玻璃体出血

[0482] 为了将在进行玻璃体切割术期间造成视网膜的进一步脱离或撕裂的可能性最小化，美国专利 5,292,509(Hageman) 先前已经提出，在去除玻璃体之前，将某些无蛋白酶的糖胺聚糖酶注射入玻璃体，从而使玻璃体与视网膜解离开或“去附着 (disinserted)”。玻璃体的这种去附着或解离的目的在于使当玻璃体被去除时视网膜被进一步撕裂或脱离的可能性最小化。可以用来实现这种玻璃体去附着 (vitrealdisinsertion) 的特定的无蛋白酶的糖胺聚糖酶的例子据称包括软骨素酶 ABC、软骨素酶 AC、软骨素酶 B、4- 硫酸软骨素酶、6- 硫酸软骨素酶、透明质酸酶和 β - 葡萄糖醛酸酶。

[0483] 尽管已经知道透明质酸酶可以用于各种眼科用途，包括美国专利 5,292,509(Hageman) 描述的玻璃体切除辅助应用，但已公开的研究已经表明透明质酸酶本身对于视网膜和 / 或眼的其他解剖学结构是有毒性的。参见 The Safety of IntravitrealHyaluronidase ;Gottleib, J.L. ;Antoszyk, A.N., Hatchell, D.L.and Soloupis,P., InvestOphthalmol Vis Sci 31 :11,2345-52(1990)。而且，使用不纯的屠宰场来源的透明质酸酶制剂可能引起眼色素层炎或眼部炎症。因此，由于其增加的效价、纯度和非动物的来源，人 sHASEGP 是优选被使用的，而对于动物来源来说，在反复的给药之后，它会引起免疫原性反应和抗体介导的中和作用。在另一实施方案中，可以将聚乙二醇化形式的 sHASEGP 注射入眼睛。此种聚乙二醇化的 sHASEGP 不会以快速的方式从玻璃体清除，从而在玻璃体中在更长的时间内维持它的活性。

[0484] 一些透明质酸酶制剂的眼毒性已经被其他研究者证实，依据动物毒性模型，这些研究者认为此类透明质酸酶制剂被用作毒性刺激物，导致实验条件下诱导的眼的新血管形成 (参见 An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in theRabbit ; Antoszyk, A.N., Gottleib, J.L., Casey, R.C., Hatchell, D.L.and Machemer, R., Invest Ophthalmol Vis Sci 32 :1,46-51(1991)。没有水银基污染物和牛或细菌来源的污染物的高度纯化的 sHASEGP 对于眼内程序是优选的。而且，考虑到其纯度、无牛病原体和具有降低的免疫原性风险，重组的人 sHASEGP 相比起屠宰场来源的制剂是优选的。最优选地，考虑聚乙二醇化的 sHASEGP。

[0485] 因此，提供了使用人 sHASEGP 来治疗哺乳动物眼的眼障碍的酶学方法。在本发明的一种实施方案中，所述 sHASEGP 被聚乙二醇化，以延长它在玻璃体内的滞留时间，并防止

在局部被摄取。新血管形成的预防和将对视网膜具有毒性的材料从玻璃体清除的速度的增加，能够通过给予一定数量的透明质酸酶来实现，这些透明质酸酶有效地液化接受治疗的眼睛的玻璃体液 (vitreous humor)，而不对眼睛产生毒性损害。玻璃状液的液化增加了玻璃体腔的液体交换的速度。该交换的增加去除了那些造成眼科损害和视网膜损害的物质和条件。

[0486] sHASEGP 的整容用途

[0487] 已经知道，透明质酸酶具有将基础物质 (fundamental substance) 的黏多糖长链解聚化的作用，而正是这些黏多糖长链使得保持住了结合水，并通过毛细压缩减慢了消除代谢废物的有机液体的扩散。水和废物的这种滞留与脂细胞的脂肪超载相关，构成了经典的“猪皮水肿 (pigskin)”水肿或“桔皮 (orange peel)”水肿。因此，该解聚作用将黏多糖的长链切割成较短的链，从而消除了结合水，消除了废物，恢复了静脉和淋巴循环，局部水肿也从而消失。

[0488] 因此，经由皮下给药的 sHASEGP 的应用，对于去除在所谓的脂肪团积聚过程中涉及的糖胺聚糖和促进淋巴流，是优选的。人 sHASEGP 对于脂肪团的处理是优选的，这是因为它能够去除所述的糖胺聚糖，而没有屠宰场来源的蛋白的促炎成分，且纯度高并不太可能具有免疫原性。sHASEGP 可以通过反复的皮下注射来给药、以药膏或乳液的形式透皮传送来给药，或通过使用可注射的缓慢释放制剂来给药，这样可以促进糖胺聚糖的持续降解，并防止它们的重新形成。

[0489] 器官移植

[0490] 透明质酸具有若干生物学作用，在某种程度上这与它的分子尺寸有关 (West, D.C., Kumar, S.Exp.Cell.Res.183,179-196,1989)。器官中的透明质酸的含量在该器官出现炎症的不同条件下会增加。因此，在表征为炎症性免疫损伤 (inflammatory-immunological injury) 例如牙槽炎 (Nettelbladt O et al, Am Rev RespDis 1989 ;139 :759-762) 和心急梗塞 (Waldenstrom et al, J Clin Invest 1991 ;88(5) :1622-1628) 的各种器官的组织中，透明质酸的浓度是增加的。其他的例子是在肾 (Ha′ llgren et al, J Exp Med 1990a ;171 :2063-2076 ;Wells et al, Transplantation 1990 ;50 :240-243)、小肠 (Wallander et al, Transplant Int 1993 ;6 :133-137) 或心脏 (Hallgren etal, J Clin Invest 1990b ;85 :668-673) 移植之后的同种异体移植排斥 ;病毒引起的心肌炎症 (Waldenstrdm et al, Eur J Clin Invest 1993 ;23 :277-282)。

[0491] 与器官移植相关的间质水肿的发生是移植手术领域中严重的问题。多达 25％的移植会肿胀到导致功能暂时失去的程度。而且，在 2-3％的情形中，肿胀导致了肾的破裂，并导致大出血。

[0492] SHASEGP 可以用于降解在器官移植中积聚的糖胺聚糖。这些糖胺聚糖的去除促进了水从移植物中去除，并因此促进了器官功能。同样地，可以以 500-10,000 单位 /kg 范围内的剂量来给药，以减少间质压力。

[0493] 糖胺聚糖在脑中的病理性积聚

[0494] 在许多脑脊髓病理状态中，透明质酸水平被提高。在成年中，脑脊髓透明质酸的水平在正常情况下小于 200μg/L(Laurent et al, Acta Neurol Scand 1996 Sep ;94(3) :194-206)。在疾病例如脑膜炎、椎管狭窄、头部损伤和脑梗塞中，这些水平可以提高

到 8,000 μ g/L 以上。因此，通过超唾液酸化 sHASEGP 的鞘内传送或全身性注射而进行的 sHASEGP 给药可以被用来降解水平提高了的底物。

[0495] 头部损伤之后，脑中缺乏有效的淋巴也能导致危及生命的水肿。透明质酸积聚是 HA 合成酶介导的合成增加和降解减少的结果。透明质酸的积聚可以增加受伤组织中的水含量，以帮助白细胞渗出，但可能是致命的。将人 sHASEGP 给予患有头部损伤的患者因此可以去除组织透明质酸积聚和与它相联系的水。人 sHASEGP 可以通过分流管 (shunt) 进行鞘内给药，或者可选择地，超唾液酸化 sHASEGP 可以被静脉内给药，从而可以到达脑组织。

[0496] 伴随着在中风中发生的脑缺血，透明质酸含量显著增加，这是由于 HA 合成酶的表达增加和分解代谢减少的缘故。离子泵失灵并且血浆泄漏入间质中，导致液体滞留，如果滞留的液体不能被淋巴系统完全清除掉，会导致组织坏死。一些研究者企图通过阻断血管渗透，来防止缺血再灌注之后的间质流体积聚。然而，一旦流体已经渗出，阻止血管渗透性则可能阻止了水肿的消解，并使情况恶化。

[0497] 人 sHASEGP 也可以用于治疗与脑瘤有关的水肿，特别是与多形性成胶质细胞瘤相关的水肿。与脑瘤有关的水肿由透明质酸的积聚产生，其处于该肿瘤附近的非癌症部分的脑中。将透明质酸酶施用于透明质酸积聚的位置（例如通过静脉注射或通过旁通管），可以通过降解这些位置过量的透明质酸来缓解与此种恶性质相关的水肿。因此，透明质酸酶能成功地治疗脑瘤，不但减少了肿瘤块并抑制肿瘤生长和 / 或转移，而且也可用于缓解与该恶性质相关的水肿。以与施用牛睾丸透明质酸酶来治疗水肿的方式相类似的方式，人 sHASEGP 可以被施用以治疗水肿（参见例如 Sa Earp Arq.Braz.Med.44 :217-20）。

[0498] 心血管疾病中的糖胺聚糖积聚的处理

[0499] 已经显示，在患有实验性心肌梗塞的动物模型中，给予透明质酸酶可以减少梗塞面积 (Maclean, et.al Science 1976 Oct 8 ;194(4261) :199-200)。牛透明质酸酶减少动物的梗塞面积的机制被认为是减少缺血再灌注之后出现的透明质酸积聚。梗塞尺寸的减少被认为是由淋巴排泄 (lymph drainage) 增加和组织氧化作用增加和心肌水含量减少引起的。尽管减少的梗塞尺寸可以在动物模型中获得，但是该好处并没有在针对人的更大的临床研究中发现。牛睾丸透明质酸酶在动物和人中具有非常短的血清半衰期，约 3 分钟 (Wolf, et.al., J Pharmacol Exp Ther 1982 Aug ;222(2) :331-7)。该短暂的半衰期是由于末端甘露糖残基的缘故，所述末端甘露糖容易被网状内皮系统的清道夫受体 (scavenger receptors) 识别。尽管小的动物由于其较小的血管床的原因可能受益于透明质酸酶，但也需要具有更长的半衰期的酶。由于不存在识别唾液酸化作用的清道夫受体，所以超唾液酸化的 sHASEGP 具有更有利的药物动力学特性。在 100-200,000 单位 /kg 范围内的超唾液酸化 sHASEGP 剂量可以被用于帮助溶解缺血再灌注后过量的透明质酸，并减少梗塞面积。

[0500] 超唾液酸化 sHASEGP 也可以被用于限制动脉硬化的冠脉斑块 (coronaryplaques)。此种斑块积聚糖胺聚糖并介导巨噬细胞和泡沫细胞粘附。Kolodgie et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol.2002 Oct 1 ;22(10) :1642-8。超唾液酸化 sHASEGP 的给药可以被用来减少斑块形成。考虑以 100-100,000U/kg 的剂量反复地给予透明质酸酶，利用低免疫原性和半衰期增加的人重组蛋白将使得斑块明显减少。

[0501] 治疗外周组织坏死

[0502] 组织坏死发生在因静脉机能不全而造成的许多疾病中。缺少足够的充氧是组织再

生的主要障碍之一。已经证明，动脉内透明质酸酶治疗显著地改善患有外周动脉阻塞性疾病的患者的临床表现 (Elder et.al，Lancet(1980)648-649)。sHASEGP 可以动脉内注射，一周 3-5 次，剂量为 10-200,000 单位。

[0503] 麻醉的增强

[0504] 屠宰场来源的透明质酸酶通常被用来在眼手术之前的局部麻醉中进行球周阻断 (peribulbar block)。该酶的存在避免了对其它阻断的需求并加速了运动不能（眼睛运动的丧失）的发作。球周和 sub-Tenon′ s 阻断是透明质酸酶在眼科手术中最常见的应用。自从 Wydase ®停产以来，复视和下垂现象的增加就已经被报导与球周阻断有关 (Brown et al J Cataract Refract Surg 1999 ;25 :1245-9)。

[0505] 由于惠氏公司停止供给 Wydase ®，牛睾丸来源的透明质酸酶材料现在由复合药剂供应。然而，对于使用临时的复合无菌产品，存在着若干问题。http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm？ cfid ＝ 11944667 & CFToken ＝ 9426953-ref#ref。复合制剂并不是 FDA 批准的产品。同样地，FDA 并没有对该制造工艺的质量和一致性的控制标准。

[0506] 10-500 单位的 SHASEGP 可以直接与 5ml 的 2％利多卡因 (Xylocaine)、5ml 的 0.5％布比卡因 (Marcaine) 以及可任选的肾上腺素 (1 ： 200,000) 混合。sHASEGP 可以用于增加运动不能的发作并减少对其它的阻断的需求。sHASEGP 对于眼睑整容和脸部整容中的整容手术时的运动不能也是理想的。sHASEGP 也可以在此种手术程序之后被使用，以扩散抗炎症剂和减少组织肿胀。

[0507] SHASEGP 也可以与缓冲溶液诸如碳酸氢钠混合，以预防在注射程序中的不适。SHASEGP 也可以与用于伤口的麻醉剂混合，以减少注射所需要的材料的总量并减少因组织肿胀引起的疼痛。

[0508] 眼内压的降低

[0509] 术后白内障患者中发生的一个普遍副效应是早期的——有时候会延长的——显著的眼内压增加。此种状况有时候是严重的，特别在具有青光眼视神经盘变化的患者中。尽管当在手术期间将粘弹性试剂例如透明质酸注射入眼睛中时，压力增加往往会更加严重，但即使不使用此种试剂，术后眼内压也会升高。而且，即使在手术过程中不使用其它附加的药物，此种压力增加也会发生。在一些情况下，让粘弹性试剂留在眼睛里是有益处的，这常常使得有必要给予患者大剂量的碳酸酐酶抑制剂。这些抑制剂通过减少房水的形成而降低眼内压，房水是正常情况下在眼睛中由睫状体分泌的流体。目前用于减缓眼睛内术后压力增加的方法包括各种类型的滴眼液，诸如 β－肾上腺能阻断剂、拟交感神经药、缩瞳药、α II 选择性试剂、碳酸酐酶抑制剂和前列腺素试剂。

[0510] 去除粘弹性试剂例如透明质酸的优选方法是在前节或后节手术程序的期间或之后紧接着注射 sHASEGP，尽管本领域已知的其他给药方法也是可能的。如果透明质酸和 sHASEGP 在前节眼手术程序期间通过注射投药于眼睛前房，可以使得透明质酸在手术程序开始期间能够充当间隔物，则是优选的。在一些角膜移植的情况中，可以在适当位置缝合角膜移植物之前，将透明质酸和 sHASEGP 组合置于眼内结构的表面。该组合也可以用于后节手术中，例如视网膜或玻璃体手术中。

[0511] 在一些情况下，在手术结束时，将粘弹性试剂例如 Healon™、Viscoat™ 或其他可占

据空间的物质置于眼的前房是明智的。对于在眼内内含物趋向于向前运动并压迫角膜后表面时的正压力升高，这是尤其适用的。如果这发生在在适当位置具有人工晶体的眼中，则角膜内皮上的压力可能显著伤害细胞并随后引起角膜肿胀，并且发生浑浊化现象，其与视力减低相关。通常，如果在手术程序结束时患者的眼内压显著升高，则有必要给予这样的患者大剂量的碳酸酐酶抑制剂，以及外用滴眼液诸如 β－阻断剂和 α II 促效药，以便减少水形成和／或增加水外流。这些试剂都具有显著的副作用，并且在一些情况下，对于具有不同医学症状例如呼吸问题、心脏病或高血压的患者，它们的使用则属于治疗不当。然而，在这些情况下使用 sHASEGP 将省去给予这些患者大剂量的此类药物的必要。

[0512] 而且，在小梁网中具有相当数量的透明质酸。sHASEGP 将分解这些透明质酸，并因此促进水通过小梁网流出。患者的眼内压将因此减小。sHASEGP 与其他前房试剂例如甲基纤维素 (Ocucoat.RTM.，例如商购自 Storz Instrument Co.)——在白内障手术中用作间隔剂和／或保护试剂——的组合也将有效地防止压力的显著升高，这是因为它将有效地打开小梁网，通过降解小梁网中存在的大量的透明质酸来排除更多的房水。

[0513] 从小梁网去除糖胺聚糖，对于患有隅角开放性青光眼的个体的眼内压的降低也是有用的。人 sHASEGP 可以通过结膜下注射或直接注射在眼前房中而被给药。

[0514] 神经节囊肿

[0515] 神经节囊肿（也称为腕囊肿、Bible 囊肿或背腱鞘囊肿）是最常见的手软组织块。它是充满流体的囊，其可以在皮肤下被感觉到。它通常附着于手或腕中的腱鞘（可润滑腱的衬里结构），或与下面的关节连接；然而，有一些并不会明显地连接于任何结构。这些神经节囊肿也可以出现在足中。当腱的衬里结构或关节上面的韧带中出现撕裂和由于韧带缺陷而造成衬里突出并导致在皮肤下形成肿块时，它便发生了。因为常常伴随有炎症，发炎的组织产生果酱样的流体，充满突出的囊。它们可以如岩石般坚硬，这是由于在该囊肿内含有压力很高的粘液样流体，它们常常被误认为是骨突出。

[0516] sHASEGP 可以被用于改善神经节囊肿。损伤区内注射入 5-1000 单位的 sHASEGP，然后进行细针抽吸，可以去除囊肿，而不需要手术。可任选地，皮质类固醇可以 sHASEGP 一起注射。对于某些患者，则还需要其他注射。

[0517] 粘液性水肿

[0518] 皮肤的糖胺聚糖 (GAG) 渗透是甲状腺功能亢进症、甲状腺功能减退症、胫前粘液性水肿、苔藓性粘液水肿和硬化病的一个特征。在所有的病况中和在正常的皮肤里透明质酸都是主要的 GAG。GAG 的皮肤分布具有最小的组织多样性。获得性皮肤粘蛋白症 (acquired cutaneous mucinoses) 显示出类似的皮肤 GAG 分布和生化组成。成纤维细胞活性的形态学差异表明，硬化病和苔藓性粘液水肿的粘蛋白症代表的是一个局部进程，而甲状腺疾病的 GAG 渗透则可能具有全身性起源。这些紊乱可以通过 sHASEGP 的局部给药和全身性给药而得以改善。对于慢性治疗，可以考虑使用聚乙二醇化的 sHASEGP。

[0519] sHASEGP 的肺部应用

[0520] 来自正常个体的支气管肺泡灌洗液 (BAL) 的透明质酸水平通常在 15ng/ml 以下。然而，在呼吸窘迫的情况下，BAL 水平大大上升 (Bjermer Br Med J(Clin Res Ed)1987 Oct 3；295(6602)：803-6)。例如，在 ARDS 中，透明质酸可以上升到 500ng/ml，然而在农民的肺中，BAL 水平可以超过 1000ng/ml(Hallgren et al Am Rev Respir Dis.1989 Mar；139(3)：

682-7),(Larrson et al Chest.1992 Jan;101(1):109-14)。在肺中增加的透明质酸可以阻止氧扩散和气体交换并且活化嗜中性粒细胞和巨噬细胞应答。

[0521] 牛透明质酸酶制剂并不是治疗此种病况的优选之物,原因有许多。首先,已经知道屠宰物睾丸来源的透明质酸酶制剂受到丝氨酸蛋白酶例如顶体蛋白酶的污染。第二,牛的酶的外源性质增加了过敏反应的可能性,其能导致患者死亡。因此,高纯度的重组人sHASEGP制剂可以通过肺或静脉内传送的方法而被传送。也可以将人sHASEGP施予患有与升高的糖胺聚糖有关的其他肺部并发症的患者,或者,给予人sHASEGP以增强其他共同传送的分子至肺部的传送。

[0522] 本发明现在将通过参考下面的非限制性实施例来进行更加详细的描述。

[0523] 实施例1

[0524] 基于微量滴定的透明质酸酶测定

[0525] 下面的实施例提供了测量sHASEGP透明质酸酶活性的快速分析方法。该分析方法可以是关于TRU、IU或NFU,其中使用W.H.O.标准的透明质酸酶制剂。

[0526] 生物素化的透明质酸微量滴定测定

[0527] 使用生物素-酰肼(Pierce)、Sulfo NHS(Pierce)和1-乙基二甲氨基丙基-碳二亚胺(Sigma),使透明质酸的葡糖醛酸残基上游离的羧基在一步反应中被生物素化。该生物素化的HA底物在第二个反应中,被共价偶联到96孔微滴定板上。酶反应完成时,残留的底物用抗生物素蛋白-过氧化物酶反应进行检测,其可以用标准的ELISA平板读数器读出。因为底物是被共价结合于微滴定板,所以矫作结果(artifact)例如生物素化底物的pH依赖性的置换没有发生。灵敏度使得能够对来自培养细胞和生物样品的透明质酸酶活性进行快速测定,分析之间的偏差小于10%。

[0528] a.实验方案

[0529] 生物素化的HA底物的制备

[0530] 在偶联到生物素之前,将100mg的HA(Sigma Chemicals)溶解于0.1M MES,pH 5.0中,至最终浓度为1mg/ml,在4℃溶解至少24小时。将Sulfo-NHS(Pierce;Rockford IL)加入到该CS04MES溶液中,至最终浓度为0.184mg/ml。将生物素酰肼(Pierce)溶解于DMSO,作为100mM的贮存液,再加入到CS04溶液,至最终浓度为1mM。将1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)的贮存液制备为溶于蒸馏水中的100mM贮存液,再加入到HA生物素溶液,至最终浓度为30mM。将该溶液在4℃搅拌过夜。未连接的生物素和EDAC通过用水透析而去除,其中3次更换1000× 体积的水。将透析过的、生物素化的HA(bHA)进行等分,可在-20℃保存达数月。

[0531] 用含有浓度为0.2mg/ml的bHA的水将Sulfo-NHS稀释至0.184mg/ml,并吸放到96孔COVALINK-NH板(NUNC;Placerville NJ),每孔50μl。将EDAC用水稀释至0.123mg/ml,并吸放到含有bHA溶液的COVALINK-NH板,结果,bHA的最终浓度为10μg/孔,EDAC的最终浓度为6.15μg/孔。将板在4℃温育过夜,或23℃温育2小时,这给出了相当的结果。将bCS04共价固定在微量滴定板上之后,通过振荡去除偶联溶液(coupling solution),并将板在含有2M NaCl和50mM$MgSO_4$的PBS(缓冲液A)中洗涤3次。该板可以保存在4℃达1周。

[0532] 带有固定化的bHA的COVALINK-NH板可以用100μl/孔的测定缓冲液平衡,测定

缓冲液是 0.1M 甲酸，pH 3.7、0.1M NaCl、1% TRITON X-100 去污剂、5mM 葡糖二酸单内酯，用于溶酶体透明质酸酶；或者是 10mM Hepes，PH 7.4，具有 1mM $CaCl_2$ 和 1mg/ml 人血清蛋白(ICN)，用于中性活性酶。用于“相对浊度降低单位”(rTRUs) 的酶活性的校准的一组标准通过下述步骤产生：用中性酶缓冲液将牛睾丸透明质酸酶 (Sigma Type VI-S) 稀释为 1.0 至 1×10^{-6} rTRU/ 孔并进行测定 100μl/ 孔，一式三份。用溶酶体酶测定缓冲液将酸性活性透明质酸酶的样品稀释为 1 ： 10 至 1 ： 130,000，按 100μl/ 孔的量移取，一式三份。对于大部分的组织提取物和人血浆分析，37℃温育 30 分钟是足够的。阳性和阴性对照孔 (分别没有酶或没有 ABC(参见下面)) 也被包括，一式三份。

[0533] 通过加入 200μl/ 孔的 6M 盐酸胍来终止反应，然后以 300μl/ 孔的量用 PBS、2M NaCl、50mM $MgSO_4$、0.05% TWEEN 20 去污剂 (缓冲液 B) 洗涤 3 次。抗生物素蛋白 - 生物素复合物 (ABC) 试剂盒 (Vector Labs；Burlingame CA) 可以在 10ml 的含有 0.1% TWEEN 20 去污剂的 PBS 中制备，其在温育期间在室温下预先温育 30 分钟。加入 ABC 溶液 (100μl/ 孔)，并在室温温育 30 分钟。将板用缓冲液 B 洗涤 5 次，然后以 100μl/ 孔的量加入 o- 苯二胺 (OPD) 底物，该底物溶液通过将 1 片 10mg 的 OPD 片剂溶解于 10ml 的 0.1M 柠檬酸 - 磷酸缓冲液，pH 5.3，并加入 7.5μl 的 30% H_2O_2 来制成。将板在黑暗中温育 10-15 分钟，然后使用 492nm 过滤器，在 ELISA 平板读数仪 (Titertek Multiskan PLUS；ICN) 上读数，通过使用 Biometallics(Princeton NJ) 的 Delta Soft II 平板读数软件的计算机来进行监控。应用了牛睾丸透明质酸酶的标准曲线可以利用通过商业渠道购得的透明质酸酶制剂的四参量曲线拟合而产生，未知样品通过它们在 492nm 的吸收值，借助于内插法而被估算出。

[0534] 为了分析透明质酸酶的 pH 依赖性，纯化的重组 sHASEGP 和牛睾丸透明质酸酶被应用。酶活性对 pH 的依赖性可以通过将纯化的 sHASEGP 或部分纯化的牛睾丸透明质酸酶用下述缓冲液稀释至 0.1rTRU 来进行测量：50mM 甲酸盐，pH3-4.5；50mM 醋酸盐，pH 5-6；50mM MES，pH 6-7；或 50mM HEPES，pH 7-8。将样品在 37℃测定 30 分钟，活性用最大活性的百分比来表示。缓冲液中不能使用 NaCl，这是因为 NaCl 能改变睾丸透明质酸酶制剂的 pH 最适宜值 (Gold，Biochem. J. 205：69-74，1982；Gacesa et al. Biochem. Soc. Trans. 7：1287-1289，1979)；生理盐浓度 (0.15M) 使得表观 pH 最适宜值降低，这一影响在睾丸酶的纯化制剂中比在原始的粗样品中更为显著。

[0535] b. 结果

[0536] 透明质酸在使用了生物素 - 酰肼和 EDAC 的一步反应中被生物素化。EDAC 是将 HA 上的游离羧基基团与生物素酰肼进行偶联，将 EDAC 进行限制，则 HA 上只有一小部分的葡糖醛酸残基被标记。将 EDAC(3×10^{-5}M) 加入到 HA(2.8×10^{-3}M)，按这一数量，则产生最大值：每 93 个 HA 二糖单位偶联 1 分子的生物素酰肼。

[0537] 制备牛睾丸透明质酸酶标准反应的四参量曲线拟合值，所述的标准反应在 pH 3.7 进行测量，并稀释为 1.0 至 1×10^{-6}TRU/ 孔。四参量曲线拟合值由方程来建立：y = ((A-D)/(1+(浓度 /C)^B))+D)，其中，$\log_{it}$ y = ln(y′ /1-y′)，y′ = (y-D)/(A-D)，B = -b/ln 10，C = EXP(a/B)。四个参量 (A、B、C、D) 用软件程序来计算，该软件程序利用了 2+2 线性回归运算法则 (Rodbard et al.，Clin. Chem. 22：350，1976)。该曲线拟合具体表现为标准曲线的 S 形特征。样品测定时的最佳准确性通常在 0.001 至 0.01TRU/ 孔温育 30 分钟时获得。在 60 分钟的温育期间，可检测到 1/1000 的 TRU。对于更小范围的值，也可以利用标准

对数曲线来建立标准曲线拟合值。尽管本发明已经依据特定的优选实施方案进行了描述，但应该理解的是，要求保护的发明不应该限于这些特定的实施方案。

[0538] 施例 2

[0539] sHASEGP cDNA 的克隆

[0540] 编码人 sHASEGP 的核酸可以由本领域技术人员通过许多方法来获得，包括但不限于人工基因合成、RT-PCR 和 cDNA 文库杂交（例如参见 Gmachl et alFEBS 336(3)1993，Kimmel et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 1993 10071-10075）。可选择地，编码人 sHASEGP 的克隆可以从 IMAGE 或人基因序列的其他供应商那里获得（Invitrogen Clone ID IOH10647）。

[0541] 全长人 PH20cDNA 经计算长为 2009 个核苷酸，含有 1530 个核苷酸的开放阅读框。5′ UTR 非同寻常的大，其可能象征滞留的内含子（retained intron），而且它可能由于 5′ UTR 中的 9 个非编码起始密码子的缘故，通过阻止核糖体结合到正确的起始甲硫氨酸密码子而抑制翻译。该蛋白（Genbank 序列号为 NP_003108）经预测包含有 509 个氨基酸，SEQ ID No.1，计算出的分子量为 58kDa。

[0542] 为了克隆的测序，PCR 扩增条带被切割，并用胶提取回收试剂盒（Qiagen）洗出，再克隆入合适的经限制性消化而具有粘末端的载体。双链 DNA 的所有测序反应依据制造商的说明进行，其中使用了 Taq 染料脱氧终止循环测序试剂盒（Applied Biosystems），是在 ABI Prism™ 自动测序仪（Applied Biosystems）上进行测序。

[0543] 使用引物 SEQ ID NO 14 和 SEQ ID NO 47 进行聚合酶链式反应，扩增人睾丸 cDNA 文库（Clontech，Palo Alto CA），获得了人 PH-20 开放阅读框。PCR 产物用 NheI 和 BamHI 消化，并克隆到载体 IRESpuro2(Clontech) 的 NheI 和 BamHI 位点。

[0544] 实施例 4

[0545] 从人 PH20cDNA 分离出 SHASEGP

[0546] 能够在哺乳动物细胞中有效进行糖基化作用的具有催化活性的分泌型重组人 sHASEGP 表达载体按照下面描述的方法产生。携带针对不同物种的启动子和选择性基因的其他表达构建物也被考虑，不同的物种诸如酵母和昆虫细胞，其也能产生 sHASEGP。也可以使用阳性选择性基因诸如谷氨酰胺合成酶和二氢叶酸还原酶（DHFR）。下面给出的例子不是为了限制目的，而是提供可以使用的若干质粒表达系统的例子。

[0547] 为了构建分泌形式的 sHASEGP，缺少疏水性 C 末端的截短变体被构建。使用 GPI 切割预测程序，GPI 锚切割位点被定位于该全长的 GPI 锚定的蛋白中的氨基酸位置 N483 附近。由 7 个嵌套 3′ 引物组成的引物组被用来构建 7 个截短的缺失变体，所述变体从位置 Y482 处开始缺少预测的 GPI 锚，并由此剔除一个又一个的氨基酸。这些引物被设计成具有相容的 NheI(5′) 和 BamHI(3′) 位点，以便将所述的截短变体克隆进载体 Irespuro2，其中或者在 3′ 引物中未用终止密码子进行标记，或者其作为 C 末端用 His 标记的蛋白质以方便纯化和检测。例如，反向引物 SEQ IDNo.8、SEQ ID No.9 和 SEQ ID No.10 被用来产生剔除突变子，以位置 Y482、F481 和 I480 为末端，无 6-His 标记。其他变体引物用同样的碱基设计产生，其中进行适当的修饰以包括和排除特定的氨基酸。为了产生 His- 标记的变异体，用于非标记的变异体的同一组引物可以被类似地使用，不同的是在各自的反向引物中缺少终止密码子，而正向引物是相同的（对于 His 标记的构建物，是指具有 SEQ ID No19、20、21、

22、23、24 和 25 的引物，它们是没有终止密码子的反向引物，对应于它们各自的构建物的非标记的反向引物）。重叠的引物被用来构建 6 个氨基酸的间隔子，然后跟着在 Irespuro2 载体中的 BamHI 和 NotI 位点内的六聚组氨酸，这样，His- 标记的变体通过在含有所述 his 标记的 Irespuro2 载体中的 NheI 和 BamH1 位点内将 PCR 扩增并经过限制性消化的产物连接起来而产生。

[0548] 为了确认人 sHASEGP 是否可以在它的羧基末端进行修饰而产生分泌型中性活性酶，在 GPI 锚附着位点至预测的“催化结构域”范围进行一系列的截短，被预测的“催化结构域”是依据与蜂毒酶的同源性获得的。

[0549] 在 IRESPuro2 中的编码人 sHASEGP 全长 GPI 锚定克隆的 DNA 被用作模板以产生各种截断的缺失变体。软件建模程序给出了全长多肽的若干预测的切割位点。这样的预测出的位点之一在氨基酸位置 N483(SEQ ID No.1)。PCR 引物被设计用来从 N483 起连续地截短蛋白质，从而产生 6 个缺失变体，以 Y482（缺少 N）开始，至 E477（缺少 P）结束。

[0550] a. 实验方案

[0551] 产生缺少 N483 的截短变体：

[0552] 在 pIRESPuro2 的 Nhe1 和 BanH1 之间的全长 GPI 锚定 sHASEGP 克隆被用作模板。该模板用含有 Nhe1 位点的 5′ 引物——其从天然信号肽的起始甲硫氨酸 M1 开始 (SEQ ID No.14)，和含有 BamHI 位点的 3′ 引物——其在 Y482 处结束 (SEQID No.8) 进行扩增。将 PCR 产物在 1％琼脂糖凝胶上跑胶，以分离并确认准确大小的扩增带，将胶纯化，用 NheI 和 BamHI 消化，再克隆入载体 pIRESPuro2(Clontech) 的 NheI 和 BamHI 位点之间，产生用于表达该 SHASEGP 截短变体的表达载体，该截短变体在氨基酸位置 Y482 处结束，缺少 GPI 锚，具有所描述的氨基酸序列 (SEQID No.5，对应于所获得的 sHASEGP 多肽的序列，直至 Y482) 和核苷酸序列 (SEQ IDNo.48：为 SEQ ID No.5 多肽的编码核苷酸）。

[0553] 其他的分别缺少 Y482、F481、I480、Q479 和 P478 的截短变体被产生。

[0554] 使用同样的策略，唯一的差异是对于各个变体使用合适的 3′ 引物。各 3′ 引物描述如下：

[0555] 用于缺少 Y482 的 sHASEGP 变体的 3′ 引物 -SEQ ID No.9

[0556] 用于缺少 F481 的变体的 3′ 引物 -SEQ ID No.10

[0557] 用于缺少 I480 的变体的 3′ 引物 -SEQ ID No.11

[0558] 用于缺少 Q479 的变体的 3′ 引物 -SEQ ID No.12

[0559] 用于缺少 P478 的变体的 3′ 引物 -SEQ ID No.13

[0560] 产生进一步的缺失变体以确定 sHASEGP 的最小化的活性结构域：

[0561] 进一步的剔除作用是从上述的 sHASEGP 截短至最内部的、序列至 E477 的中性 pH 活性截短变体的 3′ 末端，以 10 至 20 个氨基酸的氨基酸块为单位，来进行的。NheI 正向引物 SEQ ID No.14 与适当定位的 3′ 引物被用来 PCR 扩增 sHASEGP 剔除变体，其中从羧基末端剔除掉了所期望的长度。例如，用描述于 SEQ ID No.14 和 SEQ ID No.26 的引物分别作为 5′ 和 3′ 引物进行 PCR，当被 IresPuro2 载体中的表达构建物表达时，产生了 SEQ ID No.49 中的多肽。类似地，用 SEQ ID No 27、28、29、30、31 和 32 中描述的反向 3′ 引物进行 PCR，产生分别以成熟 sHASEGP 的氨基酸位置 A447、S430、G413、S394、A372 和 S347 为末端的剔除变体。在每一种情况下，PCR 产物用 Nhe1 和 BamHI 消化，消化得到的产物克隆

入 plresPuro2 载体的 NheI 和 BamHI 位点之间。通过瞬时转染入在 CD-CHO 无血清培养基(Invitrogen，CA) 中的 CHO 细胞，每一组的最终表达构建物的一些独立克隆被测试其分泌型中性活性 sHASEGP 活性，样品在指定的时间点被取出以用于测定。依照制造商推荐的实验方案，从过夜培养物制备得到的小量制备 DNA 用 Genejuice(Novagen，CA) 转染试剂转染。用上面描述的微量滴定分析方法测量透明质酸酶活性。

[0562] b. 结果

[0563] sHASEGP 截短变体的透明质酸酶活性被测量，从而鉴定出分泌型中性活性透明质酸酶活性的最小化活性结构域。

氨基酸 1 至	U/ML/24 小时 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

[0564] 结果显示，上述的所有 6 个氨基酸剔除变体——其以 Y482 至 E477 中的指示出的氨基酸为末端，均比 GPI 锚定 sHASEGP，给出更高的分泌的活性。

[0565] 结果还显示，剔除范围超过 A467 的剔除消除了所有的分泌型活性。A467 克隆的分泌型中性活性降至 P478 或 N483 克隆中所发现的活性的大约 10％。因此推断，比起先前由蜂毒酶假定的情况，需要人 sHASEGP 羧基末端区域的更多部分来产生中性活性透明质酸酶

结构域。因此,羧基末端区域中的半胱氨酸是中性活性所必需的。N483 处的 GPI 切割位点之前的约 10 个氨基酸的非常窄的范围限定了最小活性结构域。

[0566] 实施例 5 信号肽的修饰对 SHASEGP 分泌活性的影响

[0567] 人 sHASEGP 具有非常长的预测出的天然前导肽。此外,在该前导肽中的两个邻近的半胱氨酸残基的存在可能导致在高水平表达期间多肽多聚体在内质网中的聚集,并因此阻止了 sHASEGP 的高水平表达。因此,一系列更具效率的促分泌前导肽被测试,以检测它们增强 sHASEGP 靶向分泌的能力。

[0568] a. 实验方案

[0569] 通过重叠引物退火并用引物进行 PCR 延伸,构建出 Kappa 前导肽,所述的引物对应于 SEQ ID No 37、38、39 和 40 中的序列。所获得的 PCR 扩增的 kappa 序列,用侧翼引物进行扩增,所述侧翼引物在 5′ 端含有 NheI 位点(如 SEQ ID No.41 中描述),在 3′ 端含有 EcoR1 位点(如在 SEQ ID No.42 中描述)。这使得能在 Litmus39(NEB) 载体的 NheI 和 EcoRI 位点之间克隆 Kappa 前导肽(该多肽序列在 SEQ IDNo.43 中描述)。sHASEGP 具有内部 EcoRI 位点;因此,NheI 位点和 EcoRI 位点之间的该 kappa 构建物,进一步用 5′ SpeI 引物(如 SEQ ID No.44 中描述)和 3′ MluI 引物(如 SEQ ID No.45 中描述)扩增。以 P478 为末端的无 GPI 锚的 sHASEGP 用 NheI 和 BamHI 从 pIresPuro2 中切割出来,并克隆入 Litmus 39(NEB) 载体的 NheI 和 BamHI 位点内。由此获得的含有 sHASEGP 的 Litmus 载体用 SpeI 和 MluI 限制酶消化,将用 SpeI 和 MluI 引物扩增的 kappa 前导构建物克隆入该载体中。在该含有 Kappa 和 sHASEGP 序列的 Litmus 39 载体上进行定点突变,以使 sHASEGP 的成熟多肽与 Kappa 前导序列能够融合在同一阅读框架中。对应于 SEQ ID No.34 和 35 的引物对被用来产生以天然 Asp 为末端氨基酸的 kappa 前导链,该 Asp 被融合到 sHASEGP 的 F38(sHASEGP 的序列至 P478)(如 SEQ ID No.46 中描述的融合蛋白质的多肽序列)。其他引物对组合例如 SEQ ID No.33 和 SEQ ID No.35,被用来产生以 Asp(D) 为末端的 Kappa 前导链,其融合到 SHASEGP 的 L36;SEQ IDNo.33 和 SEQ ID No.36 被用来产生以 Gly(G)(在所述的末端 Asp(D) 前面)为末端的 Kappa 前导链,其融合到 SHASEGP 的 L36;SEQ ID No.34 和 SEQ ID No.36 被用来产生以 Gly(G)(在所述的末端 Asp(D) 的前面)为末端的 Kappa 前导链,其融合到 SHASEGP 的 F38。通过定点突变获得的 Kappa-sHASEGP 融合蛋白用凝胶纯化,用酶 DpnI 消化,以消化任何延续下来的亲代 DNA,然后用 Nhel 和 Bam HI 消化,并克隆入已用 NheI/BamHI 消化的 HisIresPuro2 骨架,该骨架在 pIRESPuro2 的 BarnHl 和 Notl 位点之间克隆有 his 标记 (6 个氨基酸的间隔子,随后跟着 6 个组氨酸)。因此,连接完成之后,我们获得了 pIresPuro2 中的 NheI-kappa-SHASEGP-BamHI-His 构建物。获得 4 组这样的构建物,其对应于作为 Kappa 前导链的末端的 G 或 D 和作为成熟 sHASEGP 的起始端的 L36 或 F38 的组合。来自每一类构建物的一些独立克隆被转染入 CD-CHO 培养基 (Invitrogen, CA) 中的 CHO 细胞,以测试与天然的分泌前导链相比,kappa 分泌前导链的存在是否会促进分泌蛋白质的水平增加。从过夜培养物制备获得的小量制备 DNA 用 Genejuice(Novagen,CA) 转染试剂,依据制造商推荐的方案进行转染,在指定的时间点收取样品以用于微量滴定分析测试。透明质酸酶活性按照上面描述的微量滴定分析方法来测量。

[0570] 小鼠 IgG Kappa 链前导肽 sHASEGP 融合构建物被测试,以测试出更高水平的分泌型中性活性 sHASEGP 活性。

[0571] b. 结果

人 sHASEGP 基因构建物	U/ML/24 小时，PH 7.4
IgG Kappa 前导肽 sHASEGP 氨基酸 38-478HIS6	3.0257
天然前导肽 sHASEGP 氨基酸 1-478HIS6	0.4857

[0572] 酶分析的结构表明，当与缺少 IgG Kappa 前导链的克隆 P478、Y482 或 N483 相比时，相对于天然的分泌前导链，IgG Kappa 前导链能够将 sHASEGP 的分泌增强约 7 至 8 倍。具有变化的前导链融合位点的其它 kappa 前导构建物也产生了增加水平的分泌型中性活性透明质酸酶活性，其中所述的前导链融合位点是从该 Kappa 前导链的 Asp 或 Gly 至 sHASEGP 的 L36 或 F38。这些实施例旨在扩展而不是限制本发明的范围，其他有效的促分泌前导序列可以采用同样的技术而被利用。

[0573] 实施例 6

[0574] 人 sHASEGP 表达载体的产生

[0575] 通过克隆入双顺反子表达序列盒 HZ24(SEQ ID NO 47)，产生不带表位标记的 sHASEGP。表达 sHASEGP 的 HZ24 质粒载体包括 pCI 载体骨架 (Promega)、编码人 PH20 透明质酸酶的氨基酸 1-482 的 DNA 序列、来自 ECMV 病毒 (Clontech) 的内部核糖体进入位点 (IRES) 和小鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因。pCI 载体骨架也包括编码 β - 内酰胺酶抗性基因 (AmpR) 的 DNA、f1 复制起点、巨细胞病毒即刻早期增强子 / 启动子区 (CMV)、嵌合内含子和 SV40 晚期多聚腺苷酸化信号 (SV40)。编码 sHASEGP 构建物的 DNA 在天然信号前导链的甲硫氨酸处含有 Kozak 共有序列和在酪氨酸 482 含有终止密码子。所得到的构建物 pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa(HZ-24) 导致由 CMV 启动子驱动的单一 mRNA，它编码 PH20 的氨基酸 1-482 和二氢叶酸还原酶的氨基酸 1-187，它们由内部核糖体进入位点分隔开。

[0576] 利用 5′ 引物和反向引物，将人 PH20 开放阅读框从 Invitrogen ORF 克隆 (IOH10647，CA) 中扩增出来，其中所述的 5′ 引物在 PH20 的甲硫氨酸之前引入了 NheI 位点和 Kozack 共用序列，所述的反向引物在酪氨酸 482 之后引入了终止密码子并引入了 BamH1 限制性位点。用 Nhe1 和 BamH1 消化 PH20 PCR 片断，将所得到的 PCR 产物连接入质粒 pIRESpuro2(Clontech，Palo Alto，CA)。

[0577] 实施例 7

[0578] sHASEGP 表达细胞系的产生

[0579] 将培养于补充有 4mM 谷氨酰胺和 18ml Plurionic F68/L(Gibco) 的用于 DHFR(-) 细胞的 GIBCO 改良型 CD-CHO 培养基中的未转染 DG44 CHO 细胞，在 0.5×10^6 细胞 /ml 时接种到摇瓶中以准备用于转染。细胞于 37℃培养在 5% CO_2 的湿润培养器中，并进行 120rpm 的振荡。在转染之前，测试指数生长的未转染 DG44CHO 细胞的存活率。

[0580] 将未转染的 DG44CHO 细胞培养物的 60,000,000 个存活细胞进行沉淀，并重新悬浮于 0.7mL 的 2× 转染缓冲液 (2×HeBS = 40mM Hepes，pH 7.0、274mM NaCl、10mM KCl，1.4mM Na_2HPO_4、12mM 右旋糖) 中，浓度为 20,000,000 个细胞。向每一等份的重悬浮细胞，加入 0.09mL 的线性 HZ24 质粒 (250ug)，在室温下将细胞 /DNA 溶液转移入 0.4cm 间隙 BTX(Gentronics) 电穿孔小盒。用没有混合质粒 DNA 的细胞作为阴性对照进行电穿孔。细

胞 / 质粒混合物被电穿孔时，电容器的放电条件为 330V 和 960uF 或者 350V 和 960uF。

[0581] 电穿孔之后，将细胞从小盒中移去，并转移到 5mL 的改良 CD-CHO 培养基中，该培养基是用于 DHFR(-) 细胞，补充有 4mM 谷氨酰胺和 18ml Plurionic F68/L(Gibco)，让培养物在 6 孔组织培养板的孔中生长两天而不进行选择，培养板是置于 37℃的 5％ CO_2 湿润温育器中。

[0582] 电穿孔 2 天之后，从各个孔中移出 0.5mL 的组织培养基，并测试透明质酸酶活性的存在。

[0583] 在转染后的 40 小时，HZ24 转染的 DG44CHO 细胞的初始透明质酸酶活性

	稀释	活性，单位 /ml
转染 1330V	1 至 10	0.25
转染 2350V	1 至 10	0.52
阴性对照	1 至 10	0.015

[0584] 来自转染 2(350V) 的细胞从组织培养孔中收集，计数，并稀释至每毫升 10,000 至 20,000 个存活细胞。将 0.1mL 的细胞悬浮液等份试样转移到 5 个 96 孔圆底组织培养板的各个孔中。将 0.1mL 的 CD-CHO 培养基 (GIBCO) 加入到含有细胞的孔中 (最终体积 0.2mL)，所述 CD-CHO 培养基含有 4mM Glutamax-1 并且没有次黄嘌呤和胸苷补充物。

[0585] 由在无甲氨蝶呤的条件下培养的 5 个板中鉴定得到的 10 个克隆

板 / 孔 ID	相对透明质酸酶活性
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302
1E11	242

A1(+) 对照	333
H12(-) 对照	0

[0586] 6 个 HZ24 克隆被培养放大，并作为单细胞悬浮液转移到摇瓶。使用二维无限稀释策略 (two-dimensional infinite dilution strategy)，将克隆 3D3、3E5、2G8、2D9、1E11 和 4D10 接种到 96 孔圆底组织培养板。将稀释的克隆培养在 500 个未转染 DG44CHO 细胞 / 孔的背景中，以为最初几天的培养提供必要的生长因子。每一亚克隆制备 10 个板。

[0587] 克隆 3D3 产生 24 个可见的亚克隆。这 24 个亚克隆中 8 个亚克隆的上清液中测量到了明显的透明质酸酶活性 (＞ 50 单位 /mL)，这 8 个亚克隆在存在 50nM 甲氨蝶呤的条件下放大培养于 T-25 组织培养瓶中。克隆 3D350nM 在存在 500nM 甲氨蝶呤的条件下被进一步放大，在摇瓶中获得了活性超过 1,000 单位 /ml 的克隆 (克隆 3D3 5M)。

[0588] 实施例 8

[0589] HASEGP 的产生

[0590] 将一小管的 3D3 5M 解冻，并由 T 摇瓶通过 1L 转瓶来进行放大，它们培养在补充有 100nM 甲氨蝶呤和 Glutamax(Invitrogen) 的 CHO CDM(Invitrogen，Carslbad CA) 中。细胞由转瓶转移到 5L 生物反应器 (Braun)，接种密度为 4.0×10E5 个存活细胞 /ml。参数为温度设置值 37℃、pH 7.2(起始设置值)、溶解氧设置值 25％和空气覆盖 (air overlay) 为 0-100cc/min。在 168 小时时，加入 250ml 的供给 #1 培养基 (CD CHO+50g/L 葡萄糖)。在 216 小时时，加入 250ml 的供给 #2 培养基 (CDCHO+50g/L 葡萄糖 +10mM 丁酸钠)，在 264 小时时，加入 250ml 的供给 #2 培养基。该过程产生的最终生产率为 1600 单位 /ml，最大细胞密度为 6 百万细胞 /ml。发现在生产的最后阶段加入丁酸钠显著地增加了 sHASEGP 的产量。

3D3-5M 生长 & sHASEGP 产量，5L 生物反应器

操作时间	存活细胞 ×10E5	％存活	单位 /ml	体积 (mL)	[葡萄糖]	供给料
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 供给 #1

192	66.6	98	512	4750	370	
216	55.2	92	610	4750	573	250ml 供给 #2
240	53	88	710	5000	573	
264	49.8	84	852	5000	474	250ml 供给 #2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25.4	52	1676	5250	690	

[0591] 实施例 9

[0592] sHASEGP 的纯化

[0593] 通过深度过滤和在 10mM Hepes pH 7.0 中切向流透析，将来自 3D3 克隆的条件培养基澄清化。然后通过 Q 琼脂糖 (Pharmacia) 离子交换、苯基琼脂糖 (Pharmacia) 疏水相互作用层析、苯基硼酸盐 (Prometics) 和羟磷灰石层析 (Biorad, Richmond, CA) 的连续层析，纯化可溶性 HASEGP。

[0594] SHASEGP 被结合到琼脂糖，再用含有 400mM NaCl 的同样的缓冲液洗脱。将洗脱物用 2M 硫酸铵稀释至最终浓度为 500mM ASO4，并通过苯基琼脂糖 (lowsub) 柱，然后在同样的条件下结合到苯基硼酸树脂。用 pH 9.0，无 ASO4 的 50mMN- 二 (羟乙基) 甘氨酸洗涤之后，sHASEGP 用 Hepes pH 6.9 从该苯基琼脂糖树脂上洗脱下来。将洗脱物上载到陶瓷羟磷灰石树脂上，pH 6.9，在 5mM PO4 1mM CaC12 中，再用含有 0.1mM $CaCl_2$ 的 80mM PO4pH 7.4 洗脱。

[0595] 借助于使用 USP 参考标准的微浊度分析 (microturbidity assay)，确定所获得的纯化的 sHASEGP 具有超过 65,000USP 单位 /mg 蛋白的比活性。纯化的 sHASEGP 在 24 至 26 分钟的时间里以单峰的形式，用在 0.1％ TFA/H_2O 和 0.1％ TFA/90％乙腈 /10％ H_2O 之间的梯度从 Pharmacia 5RPC 苯乙烯二乙烯基苯柱上洗脱出来，经 SDS 电泳的辨认，为单一的 61kDa 的较宽条带，而用 PNGASE-F 处理之后，其减为 51kDa 的较锐利的条带。N- 末端氨基酸测序揭示，前导肽已被有效地去除。

[0596] 生物化学方法纯化的 sHASEGP 的 N- 末端氨基酸序列。

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
理论上	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
观察到	-	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

[0597] 实施例 10

[0598] DG44CHO 来源的 sHASEGP 糖基化作用的分析

[0599] 关于来自不同物种的 sHASEGP 是否需要糖基化作用以实现它们的催化活性，存在

相互矛盾的数据。例如，据报道，具有酶促催化活性的蜜蜂蜂毒透明质酸酶可以在缺少糖基化机制的细胞诸如大肠杆菌中合成。而且，用 PNGase 处理纯化的牛睾丸透明质酸酶不会使酶活性失活 (Yamagata et al 1997)。其他研究报道，去糖基化作用之后，活性丧失，而且二硫键是额外地需要的。

[0600] 所有之前的测试都是使用粗制的或部分纯化的制剂来进行，然而，还没有弄清楚，活性的丧失是由于去糖基化的酶被暴露于粗制剂中污染的蛋白酶，还是由于糖基化作用和催化活性之间的直接功能关系。

[0601] a. 实验方案

[0602] 为了确定在无蛋白质的条件下使用 CHO 表达系统，功能性的 N- 连接糖基化作用是否能被导入人 sHASEGP，编码人 sHASEGP-HIS6 的 cDNA 被表达于 CHO 细胞中，这是通过使用 IRESpuro 双顺反子表达盒在化学成分确定的培养基中进行的。将细胞在 CHO CDM(Invitrogen/Gibco) 中培养 72 小时，然后浓缩，用 30kDa 截留膜 (cutoff membranes) 在Pellicon TFF 单元 (Millipore) 上进行切向流透析。将浓缩物与 10mM Hepes PH 7.4 50mM NaCl 进行交换。然后将透析后所得物上载在 DEAE 流线形琼脂糖树脂上，并在 Pharmacia FPLC 树脂上，用梯度为 0-1M NaCl 的 NaCl 洗脱。人 sHASEGP 用 10-30％ NaCl 洗脱下来。柱分离级分中的 sHASEGP 的水平证明，大部分的酶在 10-30％ NaCl 的梯度中被回收。来自 10-30％ NaCl 梯度的酶然后进一步通过亲合层析在带有 Ni 的 IMAC 树脂上纯化。用 50mM 醋酸盐 PH 5.0、10M Imidizole 洗涤之后，人 sHASEGP 从 IMAC 树脂上洗脱得到。浓缩该蛋白，并用 10mM Hepes PH 7.4 透析。在基于 ELISA 的生物素化底物的微量滴定分析中，测得高度纯化的酶在 1mM 钙和 1mg/ml HAS 存在的条件下，具有 97,000 单位 /mg 蛋白的比活性。

[0603] 为了检测蛋白质相对分子量的变化，纯化的人 sHASEGP 用 PNGASE 或神经氨酸酶处理过夜，然后进行凝胶电泳、电转移，用连接有抗 His6 单克隆抗体的 HRP(Qiagen) 进行蛋白质印迹分析，并进行 ECL 检测。

[0604] b. 结果

[0605] 白质印迹分析证明，在 CHO 细胞中产生的人 sHASEGP 对 PNGASE 的处理敏感。人 sHASEGP 的相对分子量显示，蛋白质是高度糖基化的。一旦用 PNGASE 进行完整的过夜消化之后，人 sHASEGP 降为单一物质，这证明未消化的条带的中度异质性可能是由 N- 连接糖残基造成的。PNGaseF 的部分消化显示出一系列的中间产物，其由未处理的蛋白转化而来，经过更长时间的处理，则发生进一步的转化。尽管条带在 7％凝胶上稍显弥散，但至少可以看见 6 个不同的中间同工异构型。

[0606] 用神经氨酸酶对 sHASEGP 进行的处理揭示，CHO 细胞事实上能够合成唾液酸化的人 sHASEGP。用神经氨酸酶进行处理，并在 7％凝胶上对 sHASEGP 进行蛋白质印迹分析后发现，与未处理的 sHASEGP 相比，CHO 来源的人重组 sHASEGP 在迁移中显示出约 1-3kDa 的变化。因此，这是第一次报道了基本上唾液酸化的人 sHASEGP 的产生。这对于人 sHASEGP 的稳定性和血清半衰期的增加都是非常有价值的，因为许多物种的天然精液 sHASEGP 缺少唾液酸化，不能与唾液酸特异性凝集素进行反应。

[0607] sHASEGP 的 FACE 分析

[0608] 利用 FACE 分析对活性 sHASEGP 寡糖进行分析，使得能够快速确定具有催化活性的 sHASEGP 的特性。

[0609] 实验方案

[0610] 使用 FACE ® N- 连接寡糖作图方法 (N-Linked Oligosaccharide Profiling) (Prozyme)，对来自 3D35M 克隆的纯化的透明质酸酶进行评价。寡糖从用 N- 聚糖酶 (a.k.a PNGase) 通过酶促消化从 128.7μg 的糖蛋白上切割下来，用荧光团 ANTS 标记，并用电泳进行分离。通过将样品以及该样品的稀释物和寡糖标准梯度物一同跑胶，确定出寡糖条件的相对位置，其中，所述寡糖标准梯度物以聚合度 (DP) 单位来表示迁移距离。

[0611] 结果

[0612] 透明质酸酶样品的N- 图由 10 个条带组成，其中的 6 个（其与寡糖标准条带 G5-G12 一同迁移）的强度大于 9％。而且，与 G9 标准物一同迁移的条带的强度最强，为 35％ -46％。

[0613] sHAS

[0614] EGP 寡糖分析

sHASEGP 寡糖	聚合度	占总数的百分比
1	15.64	1.2
2	13.68	3.4
3	11.6	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

[0615] 实施例 11

[0616] 酶活性对 SHASEGP N- 连接糖基化作用的依赖性

[0617] a. 实验方案

[0618] 将纯化的 HIS6 sHASEGP 与缓冲液在 37℃混合过夜，该缓冲液含有神经氨酸酶和 PNGASE，并含有或不含有 50mM 辛基葡糖苷。通过凝胶迁移 (gel shift)，由蛋白质印迹分析证明，寡糖已经被去除。

[0619] b.

[0620] 结果

样品	U/ML
无 Rx	22.01
神经氨酸酶 O/N 50mM 辛基葡糖苷	23.57
PNGaseFw/50mM 辛基葡糖苷	0.0
PNGaseF,无 50mM 辛基葡糖苷 o/n	10.74

[0621] 实施例 12

[0622] SHASEGP 对硫酸化的和非硫酸化的糖胺聚糖的活性

[0623] 除了使用 HA 的微量滴定分析之外，sHASEGP 对其他糖胺聚糖或蛋白聚糖的底物特异性，可以用纯化的底物利用凝胶迁移分析来测试，以确定 sHASEGP 对其他糖胺聚糖的活性。许多透明质酸酶分析是基于对新的还原性 N- 乙酰氨基基团的产生 (Bonner and Cantey, Clin.Chim.Acta 13 :746-752,1966) 或粘性的损失 (DeSalegui et al., Arch. Biochem.Bioplays.121 :548-554,1967) 或浊度 (Dorfman and Ott, J.Biol.Chem.172 : 367,1948) 的测定来进行的。采用纯化的底物时，所有这些方法都足以测定内切葡萄糖胺活性的存在或不存在。

[0624] a. 实验方案

[0625] 凝胶迁移分析 (GEL SHIFT ASSAY)——将纯化的底物与重组 sHASEGP 混合，以测试内切葡糖苷酶活性，该活性将使底物在凝胶中的迁移增加。硫酸软骨素 A，Aggrecan 和 D 来自 Calbiochem。透明质酸（人脐带）硫酸软骨素 C、硫酸皮肤素和硫酸肝素从 Calbiochem 获得。人脐带透明质酸从 ICN 获得。将每一受测底物稀释至 0.1mg/ml。将纯化的 sHASEGP 或来自表达 sHASEGP 的细胞的条件培养基的 10μl 样品与 90μl 的受测底物在理想的缓冲液中混合，在 37℃温育 3 小时。温育之后，用样品缓冲液 (Tris EDTA PH 8.0、溴酚蓝和甘油）中和样品，然后在 15％聚丙烯酰胺凝胶上电泳。将胶在含有 0.5％阿尔新蓝的 3％冰乙酸中染色过夜，然后在 7％冰乙酸中脱色，检测糖胺聚糖。通过比较在酶存在和不存在的情况下底物的迁移，来确定降解情况。

[0626] b. 结果

[0627] 将含有 100 单位的 $HASEGP_{HIS6}$ 的 10μl 溶液与带有 50μg/ml 人血清白蛋白的 90μl 10mM Hepes 缓冲液在 37℃温育 2 小时，其中含有 10μg 的各种糖胺聚糖和蛋白聚糖。电泳分析及随后的阿尔新蓝染色显示，硫酸软骨素 A、C 和 D、Aggrecan 和透明质酸中的每一种都显示出增加的迁移变化，而硫酸肝素和硫酸软骨素 B 没有显示出增加的迁移。未消化的糖胺聚糖的迁移在凝胶的中部是表现为成片的条带 (smear)，而消化的产物显示出，大部分的阿尔新蓝染色跑在染料的前端，少量的物质是以增加的梯度在迁移。

[0628] 实施例 13 金属离子对 sHASEGP 活化的影响

[0629]]除了需要糖基化作用以获得最佳酶活性之外，发现人 sHASEGP 还用阳离子激活以获得最佳的酶活性。在纯化的过程中，在连续的层析步骤之后，发现 sHASEGP 具有低的比活性。当通过 DEAE 以及随后继续的 Ni-IMAC 纯化被纯化至同质时，发现 HIS6 标记的 sHASEGP 具有非常低的比活性。因为 IMAC 树脂能螯合金属离子，所以将各种金属加回到

sHASEGP，以测定相对酶活性。

[0630] a. 实验方案

[0631] 纯化的 sHASEGP 在用 0.1mM 镍 (Ni)、钴 (Co)、锌 (Zn)、钙 (Ca) 和镁 (Mg) 在室温下温育 2 小时后，用微量滴定分析来测定透明质酸酶活性，从而对纯化的 sHASEGP 进行测试。

[0632] b. 结果

金属盐添加物	中性活性 U/ml
无添加物	11.909
100uM Ni	6.0306
100uM Co	8.972
100uM Zn	3.7476
100uM Ca	101.9892

[0633] 用 0.1mM 钙或 0.1mM 镁温育 sHASEGP 之后，发现透明质酸酶活性显著增加。用其他金属温育之后，未见此种激活作用。基于 A280 的测量，向 sHASEGP 加入钙将使酶的比活性增加至约 97,000 单位 /mg 蛋白。然后测试钙和镁金属的剂量响应曲线，以确定酶的最佳金属离子浓度。

mM 二价金属	[Ca++]	[Mg++]
100	1	1.3
10	108	104
1	169	164
0.1	123	78
0.01	59	18
0.001	47	13
0.0001	39	13
0.00001	55	15

[0634] 发现 sHASEGP 的激活作用发生在微摩尔范围内。对钙和镁来说，大于 10mM 的浓度都是抑制性的。为了排除针对底物而不是酶的非特异性激活作用，将含有氯化钙的 10mM Hepes 缓冲液与固定化的生物素化的底物在微量滴定板上温育，然后洗涤。当将酶加入到已洗涤过的用钙预温育的板上时，没有发现激活作用。该激活作用还在用磷脂酶 C 释放的天然 sHASEGP 上进行了测试，其结果显示出类似的钙激活作用，这排除了羧基末端 HIS6 表位标记可能带来的假结果。

[0635] 实施例 14

[0636] 白蛋白对 sHASEGP 活性的影响

[0637] 发现为了获得最佳活性，除了钙外，对重组 rHUPH20 和其他屠宰物睾丸来源的透明质酸酶制剂的稀释还需要白蛋白。

[0638] a. 实验方案

[0639] 将人血清白蛋白 (ICN) 稀释入含有钙的 10mM Hepes 缓冲液中，以测定白蛋白蛋白对酶活性的影响。使用 1mM $CaCl_2$ 和 1mg/ml 人血清白蛋白，对 sHASEGP 和商业制剂进行酶分析。

[0640] b. 结果

[0641] 在存在白蛋白的条件下的高度稀释，发现了透明质酸酶活性的激活。至于该激活作用是否是阻止了变性的结果，或者白蛋白是否影响了底物的可利用性，尚不清楚。因此，人 sHASEGP 的优选试剂可以包括白蛋白和由钙或镁组成的金属盐。

[0642] 实施例 15 纯化的 sHASEGP 在体内的扩散活性

[0643] a. 实验方案

[0644] 将在 10mM Hepes PH 7.4、150mM NaCl 0.1% Pluronic（普流尼克）中的纯化的 sHASEGP 用含 0.15M NaCl 的无热原的水稀释至浓度为 0.5U/ul。用盐水进行一系列的稀释，最后的体积均为 20μL，得到每一次注射量为总共 0.01、0.05、0.1 单位的产物。加入 20μL 的台盼蓝溶液至最终体积为 40μL，并皮下注射入 $balb^{Nu/Nu}$ 小鼠每一侧的侧面皮肤，这些小鼠之前已通过腹膜内注射被麻醉，例如给予氯胺酮 / 甲苯噻嗪。用微测径器，从 t = 0 至 t = 45 分钟，在 2 维方向上测量染色面积。面积用 mm^2 表示。作为对照，缺少中性活性但为分泌型的重组人 HYAL1 被包括入该实验。

[0645] b. 结果

受测项目	面积 @45 分钟
A. 盐水对照	51.5mm^2
B. sHASEGP 0.01U	76.8mm^2
C. sHASEGP 0.05U	98.22mm^2
D. sHASEGP 0.10U	180.4mm^2
E. HYAL1 100U	67.48mm^2

[0646] 实施例 16sHASEGP 扩散活性的动力学

[0647] a. 实验方案

[0648] 将重组纯化的 $sHASEGP_{His6}$ 分为 2 个等份试样。一份等份试样在带有加热盖的热循环仪中加热至 95℃共 15 分钟，另一等份试样保持在室温中。在微量滴定分析中确认酶活性的热失活。为了进行动力学分析，热失活的和天然的材料被测试。将 4 单位纯化的 sHASEGP 或等量热失活物质与台盼兰染料一同皮下注射。在长至 15 分钟之内的各个时间点测量面积。

[0649] b. 结果

4 个单位	4 个单位，热失活的
$T_{注射后分钟}$	$T_{注射后分钟}$
$t_0 = 52.38$	$t_0 = 50.58$
$t_3 = 116.51$	$t_3 = 65.48$
$t_{6.5} = 181.93$	$t_{6.5} = 63.87$
$t_{10} = 216.96$	$t_{10} = 65.80$
$t_{16} = 279.99$	$t_{16} = 74.3$

[0650] 实施例 17sHASEGP 分解的皮肤屏障的恢复

[0651] a. 实验方案

[0652] 为了确定在皮下给药后被 sHASEGP 打开的孔的再生时间，在 t = 0 时，将 2 单位的纯化的 sHASEGP 或盐水对照经皮下注射入动物的两个相对的侧面位点，然后在 30 分钟、60 分钟和 24 小时时，在同样的位点注射台盼蓝。在注射后第 15 分钟记录染料扩散的面积，并与对照相比较。

[0653] b. 结果

2 单位	盐水对照
$T_{注射\ sHASEGP\ 后小时}$	$T_{注射\ sHASEGP\ 后小时}$
$t_{0.5h} = 183$	$t_{0.5h} = 54$
$t_{1hr} = 167$	$t_{1hr} = 50$
$t_{22hr} = 61$	$t_{22hr} = 48$

[0654] 该结果显示，皮肤屏障在给予 2 单位酶之后的 24 小时内重新形成。

[0655] 实施例 18sHASEGP 开启的通道大小的测定

[0656] 已经显示，人 sHASEGP 在间质中打开了足以允许小分子例如台盼蓝染料扩散通过的通道。然而，不知道在 sHASEGP 存在的情况下可以扩散的颗粒的尺寸上限是多少。

[0657] a. 实验方案

[0658] 各种不同大小的荧光分子被用来测定由人 sHASEGP 打开的通道的大小。以 40μl 的体积，在皮下注射入平均分子量为 4,400 和 2,000,000Da 的荧光葡聚糖 (Flouresceinated Dextrans，Sigma) 以及具有 20 纳米至 500 纳米范围内的确定直径的荧光标记珠 (Molecular Probes)，然后在同样的位置注射 sHASEGP 或盐水对照。在注射后 15 分钟，在二维方向上测量染料前线包括的面积。

[0659] b. 结果

扩散试剂	扩散测试颗粒大小	15 分钟时的面积	标准偏差
sHASEGP	4400Da	84.2	25.7
对照	4400Da	38.0	5.8
sHASEGP	2×10E6Da	141.2	4.5
对照	2×10E6Da	51.7	8.1
sHASEGP	20nm 直径	92.3	20.6
对照	20nm 直径	51.6	3.0
sHASEGP	100nm 直径	61.0	5.7
对照	100nm 直径	40.0	7.0
sHASEGP	200nm 直径	35.5	1.6
对照	200nm 直径	27.9	8.2
sHASEGP	500nm 直径	44.8	13.6
对照	500nm 直径	41.2	9.8

[0660] 结果显示，给予 sHASEGP 之后，从约 1kDa（台盼蓝）至直径 50nm 的分子（乳胶珠）都显示出扩散增加。牛血清白蛋白 (66kDa) 显示出与台盼蓝相似的动力学，而 50nm 乳胶珠则需要更多的时间来扩散。500nm 珠直到 480 分钟时也没有显示出扩散。

[0661] 实施例 19 与人 SHASEGP 皮下共注射之后生物素化抗体的血清药物动力学特性

[0662] a. 实验方案

[0663] 雌性 Balb/c 小鼠用氯胺酮 / 甲苯噻嗪的混合物麻醉。然后小鼠用与 20μl 盐水或 20μL 含有 4 单位活性的 sHASEGP 相混合的 20μL 0.5mg/ml 的生物素化鼠 IgG 进行皮下注射。

[0664] b. 结果

注射后时间	对照	sHASEGP(4U)
血清 IgG t = 0 小时	0ng/ml	0ng/ml
血清 IgG t = 2 小时	0ng/ml	360ng/ml
血清 IgG t = 51 小时	4152ng/ml	4176ng/ml

[0665] 结果证明，sHASEGP 增加了大分子在循环中的血清分布动力学。在 2 小时时，对照组中没有检测到生物素化的 IgG，而在 sHASEGP 组中，在 2 小时时，明显地检测到 360ng/ml

的浓度。

[0666] 实施例 20 在静脉内注射人 sHASEGP 之后，皮下注射的分子的扩增活性

[0667] a. 实验方案

[0668] 对于每种剂量的受测物质和载剂对照，四个位点被利用来进行染料注射。染料注射在静脉注射的 45 分钟后进行。每种剂量的受测物质或对照物质被静脉注射入 2 只动物。对于每种剂量或载体对照，在酶给药 45 分钟之后进行染料注射，在 2.5、5、10 和 15 分钟计算测定的染料前沿面积。

[0669] b. 结果

[0670] 结果显示，在静脉内给药后，高度纯化的 sHASEGP 是可全身性地获得的，直至末梢组织。全身性地给予的 sHASEGP 的扩散活性是剂量依赖性的，10 单位的注射不能与载剂对照辨别开来。

类型	剂量 IV	时间 分钟	平均面积 (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
对照	0	2.5	34.652	5.935037
对照	0	5	36.279	3.614544
对照	0	10	44.687	5.821216
对照	0	15	53.002	2.812439

序列表

<110> 海洋酶公司 (Halozyme, Inc.)
A·昆度 (Kundu, Anirban)
L·布宾枫 (Bookbinder, Louis)
G·I·弗罗斯特 (Frost, Gregory I.)

<120> 可溶性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP)、
制备它们的方法、它们的用途和包含它们的药物组合物

<130>DELIA1340CN

<150>PCT/US2004/006656
<151>2004-03-05

<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> 人类 (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> 人类 (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> 人类 (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> 人类 (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 CysTyr 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> 人类 (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 Ash 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 MetGlu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr

<210>6
<211>1530
<212>DNA
<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>
<221>CDS
<222>(1)...(1530)
<223>PH-20GPI 锚定透明质酸酶糖蛋白

<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> 人类 (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> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 N483 并以 Y482 作为结束,5’端有 BamHI 位点

<400>8
aattggatcc tcagtagaaa atttgaggtt cttc 34

<210>9
<211>33
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 Y482 并以 F481 作为结束,5’端有 BamHI 位点

<400>9
aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

<210>10
<211>34
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 F481 并以 I480 作为结束,5’端有 BamHI 位点

<400>10
aattggatcc tcaaatttga ggttcttctg tctc 34

<210>11
<211>32
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 I480 并以 Q479 作为结束,5’端有 BamHI 位点

<400>11
aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

<210>12
<211>32
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 Q479 并以 P478 作为结束,5’端有 BamHI 位

点

<400>12
aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210>13
<211>31
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以生成 GPI 锚,其缺少 P478 并以 E477 作为结束,5' 端有 BamHI 位点

<400>13
aattggatcc tcattcttct gtctccatgg g 31

<210>14
<211>32
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物,5' 端带有 NheI 限制性位点

<400>14
aattgctagc atgggagtgc taaaattcaa gc 32
<210>15
<211>1473
<212>DNA
<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>
<221>CDS
<222>(1)...(1473)
<223>sHASEGP,直至 P478,带 His 标签

<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 cci 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> 人类 (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 yal 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 ProMet 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> 人工序列

<220>

<223> 间隔子 His,正向引物

<400>17

ataattggat ccggttctgg tgctcaccat caccatcac 39

<210>18

<211>38

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 间隔子 His,反向引物

<400>18

tataattgcg gccgcctaat ggtgatggtg atggtgag 38

<210>19

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不带终止密码子的 3’反向引物,用于生成缺少 GPI 锚并以 N483 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>19

aatggatcca ttgtagaaaa tttgaggttc 30

<210>20
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列 \

<220>
<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 Y482 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>20
aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc 30

<210>21
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 F481 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>21
aattggatcc gaaaatttga ggttcttctg 30

<210>22
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 I480 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>22
attggatcca atttgaggtt cttctgtctc 30

<210>23
<211>29
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 Q479 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>23

aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc 29

<210>24

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 P478 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>24

aattggatcc aggttcttct gtctccatg 29

<210>25

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不带终止密码子的 3’反向引物，用于生成缺少 GPI 锚并以 E477 结束的截短产物 HIS-sHASEGP

<400>25

aattggatcc ttcttctgtc tccatggg 28

<210>26

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物，用以扩增以 A467 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>26
aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag 36

<210>27
<211>35
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 A447 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>27
aattggatcc ctaagctttc tccttacaac tcaag 35

<210>28
<211>34
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 S430 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>28
aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt cttc 34

<210>29
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 G413 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>29
aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag 36

<210>30
<211>36

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 S394 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>30
aattggatcc ctatgaattc cagtttttcc ttatac 36

<210>31
<211>35
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 A372 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>31
aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg 35

<210>32
<211>33
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,用以扩增以 S347 结束的 sHASEGP 删除突变体

<400>32
aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg 33

<210>33
<211>29
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>LN 正向引物,用于定点诱变以生成 sHASEGP 与 kappa 前导序列的融合,
L36 作为 kappa 前导序列之后的第一个 sHASEGP 氨基酸

<400>33
ctgaatttca gagcacctcc tgttattcc 29

<210>34
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>FR 正向引物,用于定点诱变以生成 sHASEGP 与 kappa 前导序列的融合,F38 作为 kappa 前导序列之后的第一个 sHASEGP 氨基酸

<400>34
ttcagagcac ctcctgttat tccaaatg 28

<210>35
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>Asp 反向引物,用于定点诱变以生成 sHASEGP 与 kappa 前导序列的融合,Asp 作为最后一个 Kappa 前导序列氨基酸,其在 PH-20 的 L36 或 F38 之前

<400>35
gtcaccagtg gaacctggaa ccc 23

<210>36
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>Gly 反向引物,用于定点诱变以生成 sHASEGP 与 kappa 前导序列的融合,Gly 作为最后一个 Kappa 前导序列氨基酸,其在 PH-20 的 L36 或 F38 之前

<400>36
accagtggaa cctggaaccc agag 24

<210>37
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引物,其用于 kappa 前导序列的第一片段

<400>37
gagacagaca cactcctgct atgggtactg 30

<210>38
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物,其用于 kappa 前导序列的第一片段

<400>38
cccagagcag cagtacccat agcaggagtg 30

<210>39
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物,其用于 kappa 前导序列的第二片段

<400>39
ggtactgctg ctctgggttc caggttccac 30

<210>40
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物,其用于 kappa 前导序列的第二片段

<400>40
gcgtcaccag tggaacctgg aacccag 27

<210>41
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>Nhe 正向引物,用于 kappa 前导序列

<400>41
attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

<210>42
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>EcoR1 反向引物,用于 kappa 前导序列

<400>42
aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210>43
<211>21
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠 IgK- 链前导序列

<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> 人工序列

<220>
<223>K- 前导序列 SPE1 正向引物

<400>44
actcactagt gctagcatgg agacagacac 30

<210>45
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>K- 前导序列 MLU1 反向引物

<400>45
aattacgcgt gaat tcgtca ccagtggaac 30
<210>46
<211>462
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>Kappa 前导序列与 sHASEGP 的融合蛋白，F38
作为推定的成熟分泌 sHASEGP 的第一个氨基酸（直至 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 Ash 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> 人工序列
<220>
<223>3’引物 BAM 反向 sHASEGP 带有 GPI 锚,直至 L509,包括终止密码子

<400>47
aattggatcc ctacagaaga aatgataaga aacaaaatac 40

<210>48
<211>1449
<212>DNA
<213> 人类 (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> 人类 (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> 人类 (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> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223>HZ24 质粒载体

<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 tagggactt 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
catcttttc 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 ccctttttg 4980
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 5040
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5100
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttc 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> 人类 (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> 人类 (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

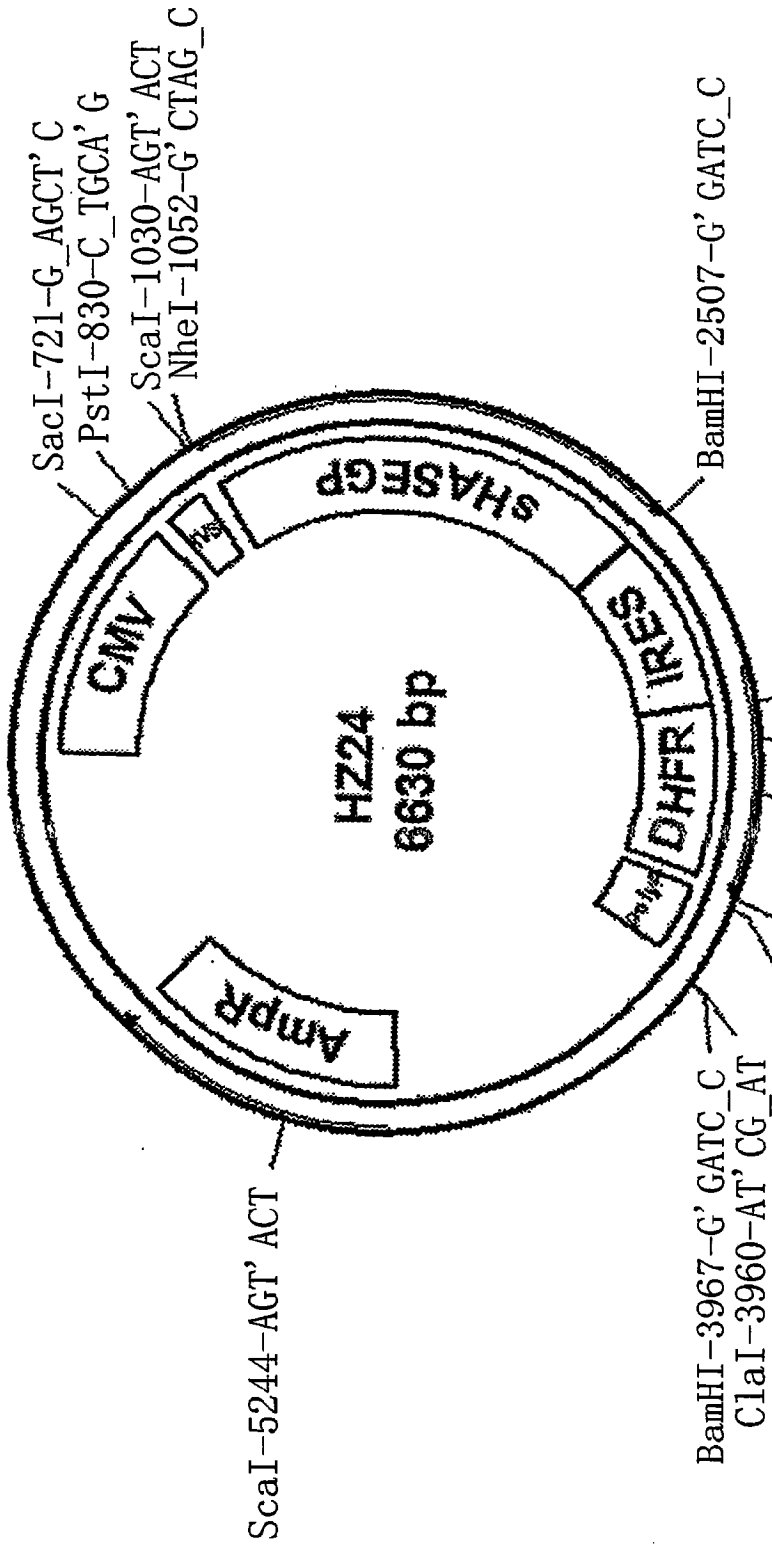

HZ24
6630 bp
CMV
SHASEGP
IRES
DHFR
AmpR
SacI-721-G_AGCT' C
PstI-830-C_TGCA' G
ScaI-1030-AGT' ACT
NheI-1052-G' CTAG_C
BamHI-2507-G' GATC_C
NotI-3115-GC' GGCC_GC
ScaI-3228-AGT' ACT
SacI-3389-G_AGCT' C
MluI-3693-A' CGCG_T
NotI-3722-GC' GGCC_GC
ClaI-3960-AT' CG_AT
BamHI-3967-G' GATC_C
ScaI-5244-AGT' ACT

图1