

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-519361

(P2011-519361A)

(43) 公表日 平成23年7月7日(2011.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54 Z N A	4 B 0 5 0
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 208 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-505021 (P2011-505021)	(71) 出願人	509136415
(86) (22) 出願日	平成21年4月14日 (2009.4.14)		ハロザイム インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年12月14日 (2010.12.14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/002352		ディエゴ ソレント バレー ロード
(87) 国際公開番号	W02009/128917		1 1 3 8 8
(87) 国際公開日	平成21年10月22日 (2009.10.22)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/195,624		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成20年10月8日 (2008.10.8)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/130,357	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成20年5月29日 (2008.5.29)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100127638
(31) 優先権主張番号	61/124,278		弁理士 志賀 美苗
(32) 優先日	平成20年4月14日 (2008.4.14)	(74) 代理人	100144923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中川 将之
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 修飾されたヒアルロニダーゼおよびヒアルロナン関連疾患および状態の治療における使用

(57) 【要約】

ヒアルロナン関連状態、疾患および障害を治療するための、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する、組合せ、組成物およびキットが提供される。一実施例では、製品は、さらなる薬剤または治療を含む。このような製品は、ヒアルロナン関連疾患および状態、例えば、ヒアルロナン関連癌、例えば、ヒアルロナンリッチな腫瘍を治療するための製品を投与するための方法において使用できる。本方法は、ヒアルロナン分解酵素組成物の、単独またはその他の治療と組み合わせた投与を含む。また、ヒアルロナン関連疾患および状態において持続した治療効果を提供する方法および組成物も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療するための、血漿中のヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも 3 U/mL のレベルで少なくとも 1 週間維持するための医薬として処方された可溶性ヒアルロニダーゼ組成物の使用であって、前記組成物がポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを前記レベルを維持するのに十分な量で含むところの、使用。

【請求項 2】

血漿中のヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも 3 U/mL のレベルで少なくとも 1 週間維持するのに十分な量で可溶性ヒアルロニダーゼを含む、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態の治療において使用するための医薬組成物であって、前記可溶性ヒアルロニダーゼがポリマーとコンジュゲートしているところの、医薬組成物。

10

【請求項 3】

組成物が少なくとも週に 2 回、少なくとも 1 週間を超える投与のためのものである、請求項 1 に記載の使用または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

組成物が、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを少なくともまたは約 $2.0 \text{ mg} \sim 60 \text{ mg}$ 含有し、

前記ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼが、少なくともまたは約 $20,000 \text{ U/mg}$ 、 $25,000 \text{ U/mg}$ 、 $30,000 \text{ U/mg}$ 、 $31,000 \text{ U/mg}$ 、 $32,000 \text{ U/mg}$ 、 $33,000 \text{ U/mg}$ 、 $34,000 \text{ U/mg}$ 、 $35,000 \text{ U/mg}$ 、 $36,000 \text{ U/mg}$ 、 $37,000 \text{ U/mg}$ 、 $38,000 \text{ U/mg}$ 、 $39,000 \text{ U/mg}$ 、 $40,000 \text{ U/mg}$ 、 $45,000 \text{ U/mg}$ 、 $50,000 \text{ U/mg}$ 、 $55,000 \text{ U/mg}$ 、 $60,000 \text{ U/mg}$ またはそれ以上の比活性を有する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の使用または組成物。

20

【請求項 5】

組成物が投与あたり少なくとも 10 mL である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 6】

組成物が経口的、静脈内 (IV)、皮下、筋肉内、腫瘍内、皮内、局所的、経皮的、直腸または表皮下投与のために処方される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の使用または組成物。

30

【請求項 7】

組成物が静脈内投与のために処方される、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 8】

組成物がヒスチジンおよび／または NaCl をさらに含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 9】

組成物が 10 mM または約 10 mM ヒスチジンおよび／または 130 mM または約 130 mM NaCl とともに処方される、請求項 8 に記載の使用または組成物。

40

【請求項 10】

組成物が、 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 もしくは 7.2 または約 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 もしくは 7.2 である pH を有する、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 11】

6.5 または約 6.5 の pH を有する、請求項 10 に記載の使用または組成物。

【請求項 12】

血漿中のヒアルロニダーゼのレベルが少なくともまたは約 $3 \text{ U/mL} \sim 12 \text{ U/mL}$ で

50

ある、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 13】

血漿中のヒアルロニダーゼのレベルが、少なくともまたは約 5 U/mL、6 U/mL、7 U/mL、8 U/mL、9 U/mL、10 U/mL、15 U/mL、20 U/mL、30 U/mL、40 U/mL、45 U/mL または 50 U/mL である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 14】

血漿中のヒアルロニダーゼのレベルが、少なくともまたは約 10 U/mL である、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 15】

ポリマーがシアル化またはペグ化部分である、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 16】

ヒアルロニダーゼ基質がヒアルロナンである、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 17】

可溶性ヒアルロニダーゼが可溶性 PH20 である、請求項 1 から 16 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 18】

PH20 がヒツジ、マウス、サル、ウシ、細菌およびヒト PH20の中から選択される、請求項 17 に記載の使用または組成物。

【請求項 19】

PH20の可溶性型がC末端 GPI を除去するよう末端切断された可溶性 PH20 である、請求項 17 または請求項 18 に記載の使用または組成物。

【請求項 20】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号 1 に含まれるアミノ酸の配列または配列番号 1 に含まれるアミノ酸の配列と少なくとも約 91% のアミノ酸配列同一性を有する配列を有し、それによって可溶性ヒアルロニダーゼが可溶性で N-グリコシル化された中性の活性である、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 21】

可溶性ヒアルロニダーゼが、アミノ酸残基 467～483 であるか、またはアミノ酸残基 467～483 の間であるアミノ酸残基で末端切断されている、配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列を含む、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 22】

可溶性ヒアルロニダーゼが、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482 および 483 の中から選択されるアミノ酸残基で末端切断されている、配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列を含む、請求項 1 から 21 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 23】

可溶性ヒアルロニダーゼが CHO 細胞において分泌される、請求項 22 に記載の使用または組成物。

【請求項 24】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号 1 のアミノ酸 36～467、36～468、36～469、36～470、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、36～482 もしくは 36～483 として示されるアミノ酸の配列を有するか、または配列番号 1 のアミノ酸 36～467、36～468、36～469、36～470、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、36～482 もしくは 36～483 として示されるアミノ酸の配列と少なくとも約

10

20

30

40

50

91%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1から23のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項25】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4～9および46～48のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有するポリペプチドならびにその対立遺伝子変異体、種変異体およびその他の変異体の中から選択される、請求項1から24のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項26】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4に示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチドである、請求項1から25のいずれかに記載の使用または組成物。

10

【請求項27】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4～9のいずれかに示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチドの中から選択される、請求項1から26のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項28】

可溶性ヒアルロニダーゼがCHO細胞における発現によって産生される、請求項1から27のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項29】

可溶性ヒアルロニダーゼが指定されたrHuPH20である、請求項28に記載の使用または組成物。

20

【請求項30】

可溶性ヒアルロニダーゼがグリコシル化されている、請求項1から29のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項31】

可溶性ヒアルロニダーゼとコンジュゲートしているポリマーがペグ化部分(PEG)を含む、請求項1から30のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項32】

ポリマーが、メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルブタノエート(mPEG-SBA)(5kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルブタノエート(mPEG-SBA)(20kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルブタノエート(mPEG-SBA)(30kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルα-メチルブタノエート(mPEG-SMB)(20kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルα-メチルブタノエート(mPEG-SMB)(30kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ーブチルアルデヒド(mPEG-ブチルアルデヒド)(30kDa)、メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルプロピオネート(mPEG-SPA)(20kDa)；メトキシーポリ(エチレングリコール)ースクシンイミジルプロピオネート(mPEG-SPA)(30kDa)；(メトキシーポリ(エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(mPEG₂-NHS)(10kDa、分岐)；(メトキシーポリ(エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(mPEG₂-NHS)(20kDa、分岐)；(メトキシーポリ(エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(mPEG₂-NHS)(40kDa、分岐)；(メトキシーポリ(エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(mPEG₂-NHS)(60kDa、分岐)；ビオチン-ポリ(エチレングリコール)-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ビオチン-PEG-NHS)(5kDa、ビオチン化)；ポリ(エチレングリコール)-p-ニトロフェニルカルボネート(PEG-p-ニトロフェニル-カルボネート)(30kDa)；およびポリ(エチレングリコール)-プロピオンアルデヒド(PEG-プロピオンアルデヒド)(30kDa)の中から選択される、請求項31に記載の使用または組成物。

30

40

50

【請求項 33】

P E G が分岐または直鎖 P E G である、請求項 32 に記載の使用または組成物。

【請求項 34】

P E G が直鎖 P E G である、請求項 33 に記載の使用または組成物。

【請求項 35】

P E G がメトキシー P E G (m P E G) である、請求項 31 から 34 のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項 36】

P E G がメトキシポリ (エチレングリコール) ブタン酸の直鎖 N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルである、請求項 35 に記載の使用または組成物。

10

【請求項 37】

P E G が 30 または約 30 キロダルトンの分子量を有する、請求項 35 または請求項 36 に記載の使用または組成物。

【請求項 38】

血漿中のヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも 3 U/mL のレベルで少なくとも 1 週間維持するのに十分な量で可溶性ヒアルロニダーゼを含む組成物であって、前記可溶性ヒアルロニダーゼがポリマーとコンジュゲートしているところの、組成物。

【請求項 39】

少なくとも週に 2 回、少なくとも 1 週間を超える投与のためのものである、請求項 38 に記載の組成物。

20

【請求項 40】

組成物が、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを少なくともまたは約 2.0 mg ~ 60 mg 含有し、

前記ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼが、少なくともまたは約 20,000 U/mg、25,000 U/mg、30,000 U/mg、31,000 U/mg、32,000 U/mg、33,000 U/mg、34,000 U/mg、35,000 U/mg、36,000 U/mg、37,000 U/mg、38,000 U/mg、39,000 U/mg、40,000 U/mg、45,000 U/mg、50,000 U/mg、55,000 U/mg、60,000 U/mg またはそれ以上の比活性を有する、請求項 38 または請求項 39 に記載の組成物。

30

【請求項 41】

組成物が投与あたり少なくとも 10 mL である、請求項 38 から 40 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 42】

組成物が、経口的、静脈内 (I V)、皮下、筋肉内、腫瘍内、皮内、局所的、経皮的、直腸または表皮下投与のために処方される、請求項 38 から 41 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 43】

組成物が静脈内投与のために処方される、請求項 38 から 42 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 44】

組成物がヒスチジンおよび／または NaCl をさらに含む、請求項 38 から 43 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 45】

組成物が 10 mM または約 10 mM ヒスチジンおよび／または 130 mM NaCl とともに処方される、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

組成物が、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1 もしくは 7.2 または約 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1 もしくは 7.2 であ

50

る pH を有する、請求項 38 から 45 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 47】

6.5 または約 6.5 の pH を有する、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 48】

血漿中のヒアルロニダーゼのレベルが、少なくともまたは約 3 U/mL ~ 12 U/mL である、請求項 38 から 47 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 49】

ポリマーがシアル化またはペグ化部分である、請求項 38 から 48 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 50】

ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを、血漿中のヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも 3 U/mL のレベルで少なくとも 1 週間維持するのに十分な量で含有する組成物と、

ヒアルロニン関連疾患または状態を治療するための第 2 の薬剤を含有する第 2 の組成物とを含む、組合せ。

【請求項 51】

可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が、少なくとも週に 2 回、少なくとも 1 週間を超える投与のためのものである、請求項 50 に記載の組合せ。

【請求項 52】

可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを少なくともまたは約 2.0 mg ~ 60 mg 含有し、

前記ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼが、少なくともまたは約 20,000 U/mg、25,000 U/mg、30,000 U/mg、31,000 U/mg、32,000 U/mg、33,000 U/mg、34,000 U/mg、35,000 U/mg、36,000 U/mg、37,000 U/mg、38,000 U/mg、39,000 U/mg、40,000 U/mg、45,000 U/mg、50,000 U/mg、55,000 U/mg、60,000 U/mg またはそれ以上の比活性を有する、請求項 50 または請求項 51 に記載の組合せ。

【請求項 53】

第 1 および第 2 の組成物が同時に処方されるか、または別個に提供される、請求項 50 から 52 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 54】

ポリマーがシアル化またはペグ化部分である、請求項 50 から 53 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 55】

第 2 の薬剤が抗癌剤または治療である、請求項 50 から 54 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 56】

抗癌剤または治療が、化学療法薬、放射線療法、抗体、ペプチド、遺伝子療法ベクター、ウイルスおよび核酸の中から選択される、請求項 55 に記載の組合せ。

【請求項 57】

第 2 の薬剤が、アシピシン；アクラルピシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アテムツズマブ；アリトレチノイン（9-Cis-レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アナキシロン；アンシタピン；アントラマイシン；アパジコン；アルギメスナ；ヒ素三酸化物；アスバラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；パノキサントロン；バタブリン；バチマスタット；生 BCG；ベナキシピン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビカルタミド；ピエタセルピン；ピリコダル；ピサントレン；ピサントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼ

10

20

30

40

50

レシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン；ブドチタン；ブス
 ルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カペシタビン；カラセミド
 ；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリフェプロザンを伴う
 カルムスチン；カルムスチン；カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；セレコキ
 シブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン；シスプラチン；ク
 ラドリピン；クランフェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シクロホスファミド；
 リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダルベポエチ
 ン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシン；ダウノルビシン
 ；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デキソナプラチン；デ
 クスラゾキササン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスビジウム；ジエノゲスト；ジナリ
 ン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン；リボソーム型ドキ
 ソルビシン；ドキソルビシンHCL；ドコルビシンHCLリボソーム注射剤；ドキソルビ
 シン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エコムス
 チン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラクリダル；エリナフィ
 ド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラチン；エンプロメー
 ト；エンザスタウリン；エピプロピジン；エピルビシン；エポエチン α ；エプタロプロス
 ト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾール；エトグルシド
 ；リン酸エトポシド；エトポシドVP-16；エトポシド；エトプリン；エキセメスタン
 ；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム
 ；フロクスウリジン；フルダラビン；フルオロウラシル；5-フルオロウラシル；フルオ
 キシメステロン；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシン；ホストリエシン；ホト
 レタミン；フルベストラント；ガラルビシン；ガロシタビン；ゲムシタビン；ゲムツズマ
 ブ／オゾガマイシン；ゲロキノール；ギマテカン；ギメラシル；グロキサゾン；グルホス
 ファミド；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ／チウキセタン；イダルビ
 シン；イホスファミド；イルモホシン；イロマスタット；メシル酸イマチニブ；イメキシ
 ン；インプロスルファン；インジスラム；インプロコン；インターフェロン α 2a；イン
 ターフェロン α 2b；インターフェロン α ；インターフェロン β ；インターフェロン γ ；
 インターフェロン；インターロイキン2および他のインターロイキン（組換えインターロ
 イキンを含む）；イントプリシン；ヨーベングアン[131-I]；イプロプラチン；イ
 リノテカン；イルソグラジン；イクサベピロン；ケトトレキサート；L-アラノシン；ラ
 ンレオチド；ラパチニブ；レドキサントロン；レトロゾール；ロイコボリン；リユープロ
 リド；リユープロレリン（リユープロレリド）；レバミソール；レキサカルシトール；リ
 アロゾール；ロバプラチン；ロメトレキサール；ロムスチン／CCNU；ロムスチン；ロ
 ナファルニブ；ロソキサントロン；ルルトテカン；マホスファミド；マンノスルファン；
 マリマスタット；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン；メクロレタミン／ナ
 イトロジェンマスタード；酢酸メゲストロール；メゲストロール；メレンゲストロール；
 メルファラン；メルファランIL-PAM；メノガリル；メピチオスタン；メルカプトプ
 リン；6-メルカプトプリン；メスナ；メテシンド；メトトレキサート；メトキサレン；
 メトミダート；メトプリン；メツレデパ；ミボプラチン；ミプロキシフェン；ミソニダゾ
 ール；ミチンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトフラキソン；ミトギリン；ミト
 グアゾン；ミトマルシン；マイトマイシンC；マイトマイシン；ミトナフィド；ミトキド
 ン；ミトスベル；ミトタン；ミトキサントロン；ミトゾロミド；ミボプリン；ミゾリピン
 ；モファロテン；モピダモール；ムブリチニブ；ミコフェノール酸；フェンプロピオン酸
 ナンドロロン；ネダプラチン；ネルザラビン；ネモルビシン；ニトラクリン；ノコダゾー
 ル；ノフェツモバブ；ノガラマイシン；ノラトレキセド；ノルトピキサントロン；オクト
 レオチド；オプレルベキン；オルマプラチン；オルタタキセル；オテラシル；オキサリプ
 ラチン；オキシスラン；オキシフェナルシン；パクリタキセル；パミドロネート；パツピ
 ロン；ペガデマーゼ；ペガスパルガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペルデシン；ペリオマ
 イシン；ペリトレキサール；ペメトレキセド；ペントムスチン；ペントスタチン；ペプロ
 マイシン；ペルホスファミド；ペリホシン；ピコプラチン；ピナフィド；ピボプロマン；

10

20

30

40

50

ピポスルファン；ピルフェニドン；ピロキサントロン；ピキサントロン；プレビトレキセド；プリカミシドミトラマイシン；プリカマイシン；プロメスタン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィマー；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロカルバジン；プロパミジン；プロスピジウム；プミテパ；ピューロマイシン；ピラゾフリン；キナクリン；ラニムスチン；ラスブリカーゼ；リボプリン；リトロスルファン；リツキシマブ；ログレチミド；ロキニメックス；ルホクロモマイシン；サバルピシン；サフィンゴール；サルグラモスチム；サトラブラチン；セブリブラチン；セムスチン；シムトラゼン；シゾフィラン；ソブゾキサン；ソラフェニブ；スパルホサート；スパルホス酸；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロブラチン；スピロブラチン；スクアラミン；ストレプトニグリン；ストレプトバリシン；ストレプトゾシン；スホスファミド；スロフェヌル；リング酸スニチニブ；6-チオグアニン（6-TG）；タセジナリン；タルク；タリソマイシン；タリムスチン；タモキシフェン；タリキダール；タウロムスチン；テコガラン；テガフル；テロキサントロン；テモボルフィン；テモゾロミド；テニポシド／VM-26；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアミプリン；チアゾフリン；チロミソール；チロロン；チムコダル；チモナシク；チラパザミン；トピキサントロン；トポテカン；トレミフェン；トシツモマブ；トラベクテジン（エクチナサイジン743）；トラスツズマブ；トレストロン；トレチノイン／ATRA；トリシリピン；トリロスタン；トリメトレキセート；四硝酸トリブラチン；トリプトレリン；トロホスファミド；ツプロゾール；ウベニメクス；ウラシルマスタード；ウレデパ；バルルピシン；バルスポダル；バプレオチド；ベルテボルフィン；ビンブラスチン；ビンクリスチン；ビンデシン；ビネビジン；ビンフルニン；ビンホルミド；ビングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロシン；ビノレルビン；ビンロシジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キサントマイシンA（グアメシクリン）；ゼニブラチン；ジラスコルブ〔2-H〕；ジノスタチン；ゾレドロネート；ゾルピシン；およびゾスキダルの中から選択される抗癌剤である、請求項50から56のいずれかに記載の組合せ。

10

20

【請求項58】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法であって、

可溶性ヒアルロニダーゼ酵素を、治療前のレベルへの基質の再合成を防ぐように、少なくとも約3 U/mLまたは3 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理的に活性なレベルを維持するのに十分な量で、1週間に1回以上、所定の数の週間、対象に投与する工程を含み、

30

前記ヒアルロニダーゼ酵素がポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されており、

前記所定の数の週間が1週間を超える、方法。

【請求項59】

所定の数の週間が少なくとも2週間である、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

所定の数の週間が2週間、3週間または4週間である、請求項58または請求項59に記載の方法。

40

【請求項61】

所定の数の週間後、投与が、第1の所定の期間中断され、次いで、少なくとも1週間再開される、請求項58から60のいずれかに記載の方法。

【請求項62】

第1の所定の期間が、少なくとも1週間である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

第1の所定の期間が、1週間、2週間、3週間または4週間である、請求項61または請求項62に記載の方法。

【請求項64】

第1の所定の期間後、治療前のレベルへの基質の再合成を防ぐように、少なくとも約3

50

U/mLまたは3 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で、1週間に1回以上、所定の数の週間、可溶性ヒアルロニダーゼを対象にさらに投与する、請求項61から63のいずれかに記載の方法。

【請求項65】

投与および投与の中断の周期が複数回反復される、請求項61から64のいずれかに記載の方法。

【請求項66】

ヒアルロニダーゼが少なくともまたは約3 U/mL～12 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で投与される、請求項58から65のいずれかに記載の方法。

10

【請求項67】

ヒアルロニダーゼが少なくともまたは約5 U/mL、6 U/mL、7 U/mL、8 U/mL、9 U/mL、10 U/mL、15 U/mL、20 U/mL、30 U/mL、40 U/mL、45 U/mL、50 U/mLまたはそれ以上の血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で投与される、請求項58から65のいずれかに記載の方法。

【請求項68】

ヒアルロニダーゼが少なくともまたは約10 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で投与される、請求項58から67のいずれかに記載の方法。

20

【請求項69】

ヒアルロニダーゼが週に2回投与される、請求項58から68のいずれかに記載の方法。

【請求項70】

ヒアルロニダーゼが、0.02 mg/kg、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.30 mg/kg、0.35 mg/kg、0.40 mg/kg、0.45 mg/kg、0.5 mg/kg、0.55 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1.0 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg（対象体重あたり）またはそれ以上の中から選択される量で投与される、請求項68から69のいずれかに記載の方法。

30

【請求項71】

ヒアルロニダーゼが、0.05 mg/kg～0.8 mg/kgの中から選択される量で投与される、請求項58から70のいずれかに記載の方法。

【請求項72】

ヒアルロニダーゼが、50,000ユニット(U)；60,000U；70,000U；80,000U；90,000U；100,000U；200,000U；300,000U；400,000U；500,000U；600,000U；700,000U；800,000U；900,000U；1,000,000U；1,500,000U；2,000,000U；2,500,000U；3,000,000U；3,500,000U；4,000,000Uもしくはそれ以上、または約50,000ユニット(U)；60,000U；70,000U；80,000U；90,000U；100,000U；200,000U；300,000U；400,000U；500,000U；600,000U；700,000U；800,000U；900,000U；1,000,000U；1,500,000U；2,000,000U；2,500,000U；3,000,000U；3,500,000U；4,000,000Uもしくはそれ以上である量で投与される、請求項58から71のいずれかに記載の方法。

40

【請求項73】

50

ヒアルロニダーゼ基質がヒアルロナンである、請求項 58 から 72 のいずれかに記載の方法。

【請求項 74】

対象由来のサンプル中のヒアルロナン発現を、治療前に測定する、請求項 58 から 73 のいずれかに記載の方法。

【請求項 75】

対象においてヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法であって、

(a) 対象由来のサンプル中のヒアルロナン発現またはヒアルロンを測定する工程と、

(b) 対象由来のサンプル中のヒアルロナン発現またはヒアルロンが上昇しているか、または疾患もしくは状態を示すレベルである場合には、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物を対象に投与する工程と

を含み、前記可溶性ヒアルロニダーゼが、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されている方法。

【請求項 76】

対象由来のサンプルが組織または体液である、請求項 74 または請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

対象由来のサンプルが血液サンプル、腫瘍生検、脳脊髄液、尿、汗、精液または唾液サンプルである、請求項 74 から 76 のいずれかに記載の方法。

【請求項 78】

疾患または状態を治療するための第 2 の異なる薬剤を対象に投与する工程をさらに含む、請求項 58 から 77 のいずれかに記載の方法。

【請求項 79】

第 2 の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が単一組成物で投与される、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

第 2 の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が別個に投与される、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 81】

第 2 の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が、同時に、任意の順序で逐次または断続的に投与される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

第 2 の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の投与後に投与される、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

第 2 の薬剤が、投与の周期中、可溶性ヒアルロニダーゼの第 1 の投与後に投与され、また可溶性ヒアルロニダーゼの 1 回または複数のその後の投与後に投与されてもよい、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

第 2 の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼのその後の投与各々の後に投与される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

第 2 の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼの 1 回おきのその後の投与後に投与される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 86】

第 2 の薬剤が、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回または 1 カ月に 1 回投与される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 87】

第 2 の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が投与された、少なくとも 0.5 分、少なくとも 1 分、少なくとも 5 分、少なくとも 15 分、少なくとも 30 分、少な

10

20

30

40

50

くとも1時間または1時間超後に投与される、請求項82から86のいずれかに記載の方法。

【請求項88】

第2の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が投与された、少なくともまたは2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間または24時間後に投与される、請求項82から86のいずれかに記載の方法。

【請求項89】

第2の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の少なくとも48時間後に投与される、請求項82から86のいずれかに記載の方法。

10

【請求項90】

第2の薬剤が、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の少なくとも72時間後に投与される、請求項82から86のいずれかに記載の方法。

【請求項91】

ポリマーがシアル化またはペグ化部分である、請求項58から90のいずれかに記載の方法。

【請求項92】

第2の薬剤が抗癌剤または治療である、請求項1から91のいずれかに記載の方法。

【請求項93】

抗癌剤または治療が化学療法薬、放射線療法、抗体、ペプチド、遺伝子療法ベクター、ウイルスおよび核酸の中から選択される、請求項92に記載の方法。

20

【請求項94】

第2の薬剤が、アシピシン；アクラルビシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アテムツズマブ；アリトレチノイン（9-C i s -レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アナキシロン；アンシタビン；アントラマイシン；アパジコン；アルギメスナ；ヒ素三酸化物；アスバラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バノキサントロン；バタブリン；バチマスタット；生BCG；ベナキシビン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビカルタミド；ビエタセルピン；ビリコダル；ビサントレン；ビサントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン；ブドチタン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カベシタビン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリフェプロザンを伴うカルムスチン；カルムスチン；カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；セレコキシブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリピン；克蘭フェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シクロホスファミド；リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダルベポエチン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシン；ダウノルビシン；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デキソナブラチン；デクスラゾキサン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスピジウム；ジエノゲスト；ジナリン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン；リボソーム型ドキソルビシン；ドキソルビシンHCL；ドコルビシンHCLリボソーム注射剤；ドキソルビシン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エコムスチン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラクリダル；エリナフィド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラチン；エンプロメート；エンザスタウリン；エピプロビジン；エビルビシン；エポエチン α ；エプタロプロスト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾール；エトグルシド；リン酸エトポシド；エトポシドVP-16；エトポシド；エトプリン；エキセメスタン；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム

30

40

50

; フロクスウリジン; フルダラビン; フルオロウラシル; 5-フルオロウラシル; フルオ
 キシメステロン; フルロシタビン; ホスキドン; ホストリエシン; ホストリエシン; ホト
 レタミン; フルベストラント; ガラルビシン; ガロシタビン; ゲムシタビン; ゲムツズマ
 ブ/オゾガマイシン; ゲロキノール; ギマテカン; ギメラシル; グロキサゾン; グルホス
 ファミド; 酢酸ゴセレリン; ヒドロキシ尿素; イブリツモマブ/チウキセタン; イダルビ
 シン; イホスファミド; イルモホシン; イロマスタット; メシル酸イマチニブ; イメキシ
 ン; インプロスルファン; インジスラム; インプロコン; インターフェロン α 2 a; イン
 ターフェロン α 2 b; インターフェロン α ; インターフェロン β ; インターフェロン γ ; 10
 インターフェロン; インターロイキン2および他のインターロイキン(組換えインターロ
 イキンを含む); イントプリシン; ヨーベングアン[131-I]; イプロブラチン; イ
 リノテカン; イルソグラジン; イクサベピロン; ケトトレキサート; L-アラノシン; ラ
 ンレオチド; ラパチニブ; レドキサントロン; レトロゾール; ロイコボリン; リュープロ
 リド; リュープロレリン(リュープロレリド); レバミソール; レキサカルシトール; リ
 アロゾール; ロバブラチン; ロメトレキサール; ロムスチン/C C N U; ロムスチン; ロ
 ナファルニブ; ロソキサントロン; ルルトテカン; マホスファミド; マンノスルファン;
 マリマスタット; マソプロコール; メイタンシン; メクロレタミン; メクロレタミン/ナ
 イトロジェンマスタード; 酢酸メゲストロール; メゲストロール; メレンゲストロール;
 メルファラン; メルファラン I L-P A M; メノガリル; メピチオスタン; メルカプトプ
 リン; 6-メルカプトプリン; メスナ; メテシンド; メトトレキサート; メトキサレン;
 メトミダート; メトプリン; メツレデバ; ミボブラチン; ミプロキシフェン; ミソニダゾ
 ール; ミチンドミド; ミトカルシン; ミトクロミン; ミトフラキソン; ミトギリン; ミト
 グアゾン; ミトマルシン; マイトマイシンC; マイトマイシン; ミトナフィド; ミトキド
 ン; ミトスベル; ミトタン; ミトキサントロン; ミトゾロミド; ミボプリン; ミゾリピン
 ; モファロテン; モピダモール; ムブリチニブ; ミコフェノール酸; フェンプロピオン酸
 ナンドロロン; ネダブラチン; ネルザラビン; ネモルビシン; ニトラクリン; ノコダゾー
 ル; ノフェツモバブ; ノガラマイシン; ノラトレキセド; ノルトピキサントロン; オクト
 レオチド; オブレルベキン; オルマブラチン; オルタタキセル; オテラシル; オキサリブ
 ラチン; オキシスラン; オキソフェナルシン; パクリタキセル; パミドロネート; パツピ
 ロン; ペガデマーズ; ペガスバルガーゼ; ペグフィルグラスチム; ペルデシン; ペリオマ
 イシン; ペリトレキサール; ペメトレキセド; ペンタムスチン; ペントスタチン; ペプロ
 マイシン; ペルホスファミド; ペリホシン; ピコブラチン; ピナフィド; ピボプロマン;
 ピボスルファン; ピルフェニドン; ピロキサントロン; ピキサントロン; プレビットレキセ
 ド; プリカミシドミトラマイシン; プリカマイシン; プロメスタン; プロメスタン; ポル
 フィマーナトリウム; ポルフィマー; ポルフィロマイシン; プレドニムスチン; プロカル
 バジン; プロバミジン; プロスピジウム; プミテバ; ピューロマイシン; ピラゾフリン;
 キナクリン; ラニムスチン; ラスブリカーゼ; リボプリン; リトロスルファン; リツキシ
 マブ; ログレチミド; ロキニメックス; ルホクロモマイシン; サバルビシン; サフィンゴ
 ール; サルグラモスチム; サトラブラチン; セブリブラチン; セムスチン; シムトラゼン
 ; シゾフィラン; ソブゾキサン; ソラフェニブ; スパルホサート; スパルホス酸; スパル
 ソマイシン; スピロゲルマニウム; スピロムスチン; スピロブラチン; スピロブラチン;
 スクアラミン; ストレプトニグリン; ストレプトバリシン; ストレプトゾシン; スホスフ
 アミド; スロフェヌル; リンゴ酸スニチニブ; 6-チオグアニン(6-T G); タセジナ
 リン; タルク; タリソマイシン; タリムスチン; タモキシフェン; タリキダール; タウロ
 ムスチン; テコガラシ; テガフル; テロキサントロン; テモボルフィン; テモゾロミド
 ; テニボシド/V M-2 6; テニボシド; テロキシロン; テストラクトン; チアミプリン
 ; チオグアニン; チオテバ; チアミプリン; チアゾフリン; チロミソール; チロロン; チ
 ムコダル; チモナシク; チラパザミン; トピキサントロン; トボテカン; トレミフェン
 ; トシツモマブ; トラベクテジン(エクチナサイジン743); トラスツズマブ; トレス
 トロン; トレチノイン/A T R A; トリシリピン; トリロスタン; トリメトレキサート;
 四硝酸トリブラチン; トリプトレリン; トロホスファミド; ツプロゾール; ウベニメクス 50

；ウラシルマスタード；ウレデパ；バルルビシン；バルスポダル；バプレオチド；ベルテポルフィン；ビンブラスチン；ビנקリスチン；ビンデシン；ビネビジン；ビンフルニン；ビンホルミド；ビングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロシン；ビノレルビン；ビンロシジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キサントマイシンA（グアメシクリン）；ゼニプラチン；ジラスコルブ〔2-H〕；ジノスタチン；ゾレドロネート；ゾルビシン；およびゾスキダルの中から選択される抗癌剤である、請求項1から93のいずれかに記載の方法。

【請求項95】

可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤が局所的または全身的に投与される、請求項58から94のいずれかに記載の方法。

10

【請求項96】

可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤が、経口的に、静脈内に（IV）、皮下に、筋肉内に、腫瘍内に、皮内、局所的に、経皮的に、直腸性にまたは表皮下に投与される、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤が静脈内に投与される、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤が腫瘍内に投与される、請求項96に記載の方法。

20

【請求項99】

対象由来のサンプル中のヒアルロナンの発現を、対照サンプル中の発現または標準と比較する工程をさらに含む、請求項74から98のいずれかに記載の方法。

【請求項100】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態が高間質液圧に関連している、請求項58から99のいずれかに記載の方法。

【請求項101】

疾患または状態が椎間板圧迫、癌および浮腫の中から選択される、請求項58から100のいずれかに記載の方法。

【請求項102】

30

疾患または状態が浮腫であり、浮腫が臓器移植、卒中または脳外傷によって引き起こされる、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

疾患または状態が癌であり、癌が腫瘍である、請求項101に記載の方法。

【請求項104】

疾患または状態が固形腫瘍である、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

腫瘍が同一組織種の非癌性組織と比較して、または同一腫瘍種の非転移性腫瘍と比較して、ヒアルロナンの細胞発現および／または間質発現を増大させている、請求項104に記載の方法。

40

【請求項106】

疾患または状態が、後期癌、転移性癌および未分化癌のうち任意の1種または複数の中から選択される、請求項101に記載の方法。

【請求項107】

疾患または状態が、卵巣癌、in situ癌腫（ISC）、扁平上皮癌（SCC）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、脳癌および結腸癌のうち任意の1種または複数の中から選択される、請求項58から106のいずれかに記載の方法。

【請求項108】

可溶性ヒアルロニダーゼが可溶性PH20である、請求項58から107のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 109】

PH20がヒツジ、マウス、サル、ウシ、細菌およびヒトPH20の中から選択される、請求項108に記載の方法。

【請求項 110】

PH20の可溶性型が、C末端GPIを除去するよう末端切断された可溶性PH20である、請求項108または請求項109に記載の方法。

【請求項 111】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号1に含まれるアミノ酸の配列または配列番号1に含まれるアミノ酸の配列と少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性を有する配列を有し、それによって可溶性ヒアルロニダーゼが、可溶性でN-グリコシル化された中性の活性である、請求項58から110のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 112】

可溶性ヒアルロニダーゼが、アミノ酸残基467～483であるか、またはアミノ酸残基467～483の間であるアミノ酸残基で末端切断されている、配列番号1に示されるアミノ酸の配列を含む、請求項58から111のいずれかに記載の方法。

【請求項 113】

可溶性ヒアルロニダーゼが、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482および483の中から選択されるアミノ酸残基で末端切断されている、配列番号1に示されるアミノ酸の配列を含む、請求項58から112のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 114】

可溶性ヒアルロニダーゼがCHO細胞において分泌される、請求項58から113のいずれかに記載の方法。

【請求項 115】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号1のアミノ酸36～467、36～468、36～469、36～470、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、36～482もしくは36～483として示されるアミノ酸の配列を有するか、または配列番号1のアミノ酸36～467、36～468、36～469、36～470、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、36～482もしくは36～483として示されるアミノ酸の配列と少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項58から114のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 116】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4～9および46～48のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有するポリペプチドならびにその対立遺伝子変異体、種変異体およびその他の変異体の中から選択される、請求項58から115のいずれかに記載の方法。

【請求項 117】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4に示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチドである、請求項58から116のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 118】

可溶性ヒアルロニダーゼが、配列番号4～9のいずれかに示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチドの中から選択される、請求項58から117のいずれかに記載の方法。

【請求項 119】

可溶性ヒアルロニダーゼがCHO細胞における発現によって産生される、請求項118に記載の方法。

【請求項 120】

可溶性ヒアルロニダーゼが指定されたrHuPH20である、請求項119に記載の方

50

法。

【請求項 1 2 1】

可溶性ヒアルロニダーゼがグリコシル化されている、請求項 5 8 から 1 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 2】

可溶性ヒアルロニダーゼとコンジュゲートしているポリマーが、ペグ化部分 (PEG) を含む、請求項 5 8 から 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 3】

ポリマーが、メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (5 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (20 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (30 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジル α -メチルブタノエート (mPEG-SMB) (20 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジル α -メチルブタノエート (mPEG-SMB) (30 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) ブチルアルデヒド (mPEG-ブチルアルデヒド) (30 kDa) 、メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジルプロピオネート (mPEG-SPA) (20 kDa) ; メトキシポリ (エチレングリコール) スクシンイミジルプロピオネート (mPEG-SPA) (30 kDa) ; (メトキシポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (10 kDa、分岐) ; (メトキシポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (20 kDa、分岐) ; (メトキシポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (40 kDa、分岐) ; (メトキシポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (60 kDa、分岐) ; ビオチンポリ (エチレングリコール)-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ビオチン-PEG-NHS) (5 kDa、ビオチン化) ; ポリ (エチレングリコール)-p-ニトロフェニルカルボネート (PEG-p-ニトロフェニルカルボネート) (30 kDa) ; およびポリ (エチレングリコール)-プロピオンアルデヒド (PEG-プロピオンアルデヒド) (30 kDa) の中から選択される、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

PEG が分岐または直鎖 PEG である、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

PEG が直鎖 PEG である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

PEG がメトキシPEG (mPEG) である、請求項 1 2 2 から 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 7】

PEG がメトキシポリ (エチレングリコール) ブタン酸の直鎖 N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルである、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

PEG が 30 または約 30 キロダルトンの分子量を有する、請求項 1 2 6 または請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

治療が対象において腫瘍の大きさの低減をもたらす、請求項 5 8 から 1 2 8 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

10

20

30

40

50

2004年4月14日に出願された、「COMBINATION USING A MODIFIED SOLUBLE HYALURONIDASE AND THERAPEUTIC AGENTS AND TREATMENTS」と題されたGregory Frostの米国仮出願番号第61/124, 278号；2008年5月29日に出願された「COMBINATION THERAPY USING A SOLUBLE HYALURONIDASE AND CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS」と題されたGregory Frostの米国仮出願番号第61/130, 357号；および2008年10月8日に出願された「MODIFIED HYALURONIDASES AND USES IN TREATING HYALURONAN-ASSOCIATED DISEASES AND CONDITIONS」と題されたGregory Frostの米国仮出願番号第61/195, 624号の優先権の利益が主張される。

【0002】

本願は、米国仮出願番号第61/124, 278号、同61/130, 357号および同61/195, 624号の優先権を主張する「MODIFIED HYALURONIDASES AND USES IN TREATING HYALURONAN-ASSOCIATED DISEASES AND CONDITIONS」と題された、これと同日に出願された、米国特許出願番号第（代理人整理番号0119374-00091/3066）と関連する。上記の関連出願の主題は、その全文において参照により組み込まれる。

【0003】

上記の参照される出願各々の主題は、その全文において参照によって組み込まれる。

【0004】

ヒアルロナン関連状態、疾患および障害の治療のための、ヒアルロナン分解酵素、特に、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組合せ、組成物およびキットが提供される。一実施例では、製品は、さらなる薬剤または治療を含む。このような製品は、ヒアルロナン関連疾患および状態、例えば、ヒアルロナン関連癌、例えば、ヒアルロナンリッチな腫瘍を治療するために製品を投与するための方法において使用してもよい。これらの方法は、単独またはその他の治療と組み合わせた、ヒアルロナン分解酵素組成物、例えば、ヒアルロニダーゼ組成物の投与を含む。ヒアルロナン関連疾患および状態において持続した治療効果を提供するための方法および組成物も提供される。

【背景技術】

【0005】

ヒアルロナン（ヒアルロン酸；HA）は、哺乳類において結合組織、皮膚、軟骨中に、および滑液中に主に存在するグリコサミノグリカンである。ヒアルロナンはまた、眼の硝子体の主要な成分である。結合組織では、ヒアルロナンと結合している水和の水は、組織間の水和マトリックスを作り出す。HAは、多数の細胞の細胞外マトリックス中、特に、柔結合組織中に見られる。HAは、細胞内マトリックスにおいて種々の生理学的過程において、例えば、水および血漿タンパク質ホメオスタシスにおいて役割を有する(Laurent T C et al(1992) FASEB J 6: 2397-2404)。特定の疾患は、ヒアルロナンの発現および／または産生と関連している。

【0006】

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナンを分解する酵素である。種々のヒアルロナン分解酵素が、その他の治療薬と組み合わせて、通常、分散剤および展着剤として治療的に使用されている。特に、ヒアルロナン関連疾患および状態の治療のための、ヒアルロナン分解酵素の投与のための改善された組成物および方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

10

20

30

40

50

ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するための方法が提供される。これらの方法は、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、特に、可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、動物または細菌ヒアルロニダーゼのいずれかを投与する工程を含む。ヒアルロナン分解酵素は、ペグ化部分などのポリマーで修飾される。このようなヒアルロナン分解酵素の例として、可溶性ヒトヒアルロニダーゼがある。このような可溶性ヒアルロニダーゼおよびその処方、例えば、US 20040268425として公開される、同時係属米国特許出願番号第10/795,095号、US 20050260186として公開される、米国特許出願番号第11/065,716号、US 20060104968として公開される米国特許出願番号第11/238,171号に記載されている。このような可溶性ヒアルロニダーゼは、ペグ化部分などのポリマーで修飾される。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、それだけには限らないが、半減期および薬物動態 (pharmacokinetics) などの特性を変更するようにポリマーで修飾される。修飾は、直接的またはリンカーを介して間接的に、例えば、共有結合によって、またはその他の適した連結によって、デキストラン、ペグ化もしくはシアル化 (sialylation) 部分などのポリマーまたは天然もしくは糖ポリマーなどのその他のこのようなポリマーを連結することを含む。本明細書において例示的实施形態では、ヒアルロナン分解酵素は、ペグ化される。

10

【0008】

本明細書では、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法およびヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法が提供される。このような方法は、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されている可溶性ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase) を投与することを含む。また、本明細書では、少なくとも3 U/mLのレベルで血漿におけるヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも1週間維持するのに十分な量で可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物およびこのような組成物を含有する組合せも提供される。本明細書において提供される組成物および組合せ中の可溶性ヒアルロニダーゼは、ポリマーとコンジュゲートされている。

20

【0009】

本明細書において、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法が提供される。これらの方法は、可溶性ヒアルロニダーゼ酵素を、治療前のレベルへの基質の再合成を防ぐよう、少なくとも約3 U/mLまたは3 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で、1週間に2回以上、所定の数の週間、対象に投与することを含む。本方法において使用されるヒアルロニダーゼ酵素は、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されており、所定の数の週間は、1週間を超える。いくつかの実施例では、所定の数の週間は、少なくとも2週間、例えば、2週間、3週間または4週間である。治療されている状態または疾患において蓄積する例示的ヒアルロニダーゼ基質として、ヒアルロナンが挙げられる。一実施例では、対象由来のサンプルにおけるヒアルロナン発現を治療に先立って測定する。

30

【0010】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法のいくつかの例では、所定の数の週間後、投与が、最初の所定の期間、例えば、少なくとも1週間中断され、次いで、少なくとも1週間再開される。例えば、投与は、1週間、2週間、3週間または4週間中断され、次いで、少なくとも1週間再開され得る。さらなる例では、最初の所定の期間後、可溶性ヒアルロニダーゼが、治療前のレベルへの基質の再合成を防ぐよう、少なくとも約3 U/mLまたは3 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に活性なレベルを維持するのに十分な量で、1週間に2回以上、所定の数の週間、さらに対象に投与される。これらの方法のいずれかのいくつかの実施形態では、投与および投与の中断の周期は、複数回反復される。

40

【0011】

本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼは、少なくとも、または約3 U/mL~12 U/mLの血漿中のヒアルロニダーゼの薬理学的に

50

活性なレベルを維持するのに十分な量で投与される。例えば、ヒアルロニダーゼは、少なくとも、または約 5 U/mL、6 U/mL、7 U/mL、8 U/mL、9 U/mL、10 U/mL、15 U/mL、20 U/mL、30 U/mL、40 U/mL、45 U/mL、50 U/mL またはそれ以上の血漿中のヒアルロニダーゼの薬理的に活性なレベルを維持するのに十分な量で投与され得る。本方法の特定の実施形態では、ヒアルロニダーゼは、少なくとも、または約 10 U/mL の血漿中のヒアルロニダーゼの薬理的に活性なレベルを維持するのに十分な量で投与される。

【0012】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法の一実施形態では、ヒアルロニダーゼは、週に 2 回投与される。対象に投与されるヒアルロニダーゼの量は、例えば、0.02 mg/kg（対象の）、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.30 mg/kg、0.35 mg/kg、0.40 mg/kg、0.45 mg/kg、0.5 mg/kg、0.55 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1.0 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg またはそれ以上であり得る。一例では、投与されるヒアルロニダーゼの量は、0.05 mg/kg ~ 0.8 mg/kg である。さらなる例では、投与されるヒアルロニダーゼ（hyaluronidase）の量は、50,000 ユニット（U）；60,000 U；70,000 U；80,000 U；90,000 U；100,000 U；200,000 U；300,000 U；400,000 U；500,000 U；600,000 U；700,000 U；800,000 U；900,000 U；1,000,000 U；1,500,000 U；2,000,000 U；2,500,000 U；3,000,000 U；3,500,000 U；4,000,000 U またはそれ以上、または約 50,000 ユニット（U）；60,000 U；70,000 U；80,000 U；90,000 U；100,000 U；200,000 U；300,000 U；400,000 U；500,000 U；600,000 U；700,000 U；800,000 U；900,000 U；1,000,000 U；1,500,000 U；2,000,000 U；2,500,000 U；3,000,000 U；3,500,000 U；4,000,000 U またはそれ以上である。

【0013】

本明細書において、対象においてヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法が提供される。このような方法は、（a）対象由来のサンプル中のヒアルロナン発現またはヒアルロンを測定する工程；および（b）対象由来のサンプル中のヒアルロナン発現またはヒアルロンが上昇している、または疾患もしくは状態を示すレベルである場合には、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物を対象に投与する工程を含む。これらの方法において使用される可溶性ヒアルロニダーゼは、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾される。いくつかの例では、対象から得られるサンプルは、例えば、血液サンプル、腫瘍生検、脳脊髄液、尿、汗、精液または唾液サンプルなどの組織または体液である。

【0014】

ヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法の特定の実施形態では、疾患または状態を治療するための第 2 の、異なる薬剤が対象に投与される。いくつかの例では、第 2 の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が、単一の組成物で投与される。その他の例では、第 2 の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼ（hyaluronidase）を含有する組成物は、別個に、例えば、同時に、任意の順序で逐次または断続的に投与される。一実施形態では、第 2 の薬剤は、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の投与後に投与される。例えば、第 2 の薬剤は、投与の周期中、可溶性ヒアルロニダーゼの第 1 の投与後に、また所望により、可溶性ヒアルロニダーゼの 1 回または複数のその後の投与後に、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼの各回のその後の投与後に、可溶性ヒアルロニダーゼの 1 回おきのその後の投与後に、または 1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1

回、1カ月に1回投与されてもよい。

【0015】

本明細書に提供されるヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法のいくつかの態様では、第2の薬剤は、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が投与された後、少なくとも0.5分、少なくとも1分、少なくとも5分、少なくとも15分、少なくとも30分、少なくとも1時間または1時間を超えて投与される。いくつかの例では、第2の薬剤は、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物が投与された、少なくともまたは2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間または24時間後に投与される。一例では、第2の薬剤は、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の少なくとも48時間後に投与される。別の例では、第2の薬剤は、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の少なくとも72時間後に投与される。ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するための、本明細書において提供される方法のさらなる態様では、対象由来のサンプルにおけるヒアルロナンの発現を、対照サンプルにおける発現または標準と比較する。

【0016】

ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法およびヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法において使用されるヒアルロニダーゼは、ポリマーとコンジュゲートしている。いくつかの例では、ポリマーは、シアル化またはペグ化部分である。本明細書において提供される方法の一部では、第2の薬剤は、上記および本明細書において記載されるように対象に投与される。いくつかの例では、第2の薬剤は、抗癌剤または例えば、化学療法薬、放射線療法、抗体、ペプチド、遺伝子療法ベクター、ウイルスまたは核酸などの治療である。本明細書において提供される方法の一部において使用される例示的第2の薬剤として、例えば、アシビシン；アクラルビシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アテムツズマブ；アリトレチノイン（9-C i s -レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アナキシロン；アンシタビン；アントラマイシン；アパジコン；アルギメスナ；ヒ素三酸化物；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バノキサントロン；バタブリン；バチマスタット；生BCG；ベナキシピン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビカルタミド；ビエタセルピン；ビリコダル；ビサントレン；ビサントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン；ブドチタン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カペシタビン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリフェプロザンを伴うカルムスチン；カルムスチン；カルビシン；カルゼレシン；セデフィノール；セレコキシブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリピン；克蘭フェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シクロホスファミド；リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダルベポエチン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシン；ダウノルビシン；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デキソナプラチン；デクスラゾキサン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスピジウム；ジエノゲスト；ジナリン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン；リボソーム型ドキソルビシン；ドキソルビシンHCL；ドコルビシンHCLリボソーム注射剤；ドキソルビシン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エコムスチン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラクリダル；エリナフィド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラチン；エンプロメート；エンザスタウリン；エビプロビジン；エビルビシン；エポエチン α ；エプタロプロスト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾール；エトグルシド；リン酸エトポシド；エトポシドVP-16；エトポシド；エトプリン；エキセメスタン；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド

; フィルグラスチム; フロクスウリジン; フルダラビン; フルオロウラシル; 5-フルオ
 ロウラシル; フルオキシメステロン; フルロシタビン; ホスキドン; ホストリエシン; ホ
 ストリエシン; ホトレタミン; フルベストラント; ガラルビシン; ガロシタビン; ゲムシ
 タビン; ゲムツズマブ/オゾガマイシン; ゲロキノール; ギマテカン; ギメラシル; グロ
 キサゾン; グルホスファミド; 酢酸ゴセレリン; ヒドロキシ尿素; イブリツモマブ/チウ
 キセタン; イダルビシン; イホスファミド; イルモホシン; イロマスタット; メシル酸イ
 マチニブ; イメキソン; インプロスルファン; インジスラム; インプロコン; インターフ
 エロン α 2 a; インターフェロン α 2 b; インターフェロン α ; インターフェロン β ; イン
 ターフェロン γ ; インターフェロン; インターロイキン2および他のインターロイキン
 (組換えインターロイキンを含む); イントプリシン; ヨーベングアン [131-I]; 10
 イプロプラチン; イリノテカン; イルソグラジン; イクサベピロン; ケトトレキサート;
 L-アラノシン; ランレオチド; ラパチニブ; レドキサントロン; レトロゾール; ロイコ
 ボリン; リュープロリド; リュープロレリン (リュープロレリド); レバミソール; レキ
 サカルシトール; リアロゾール; ロバプラチン; ロメトレキサール; ロムスチン/C C N
 U; ロムスチン; ロナファルニブ; ロソキサントロン; ルルトテカン; マホスファミド;
 マンノスルファン; マリマスタット; マソプロコール; メイタンシン; メクロレタミン;
 メクロレタミン/ナイトロジェンマスタード; 酢酸メゲストロール; メゲストロール; メ
 レングストロール; メルファラン; メルファラン I L-P A M; メノガリル; メピチオス
 タン; メルカプトプリン; 6-メルカプトプリン; メスナ; メテシンド; メトトレキサート
 ; メトキサレン; メトミダート; メトプリン; メツレデバ; ミボプラチン; ミプロキシ 20
 フェン; ミソニダゾール; ミチンドミド; ミトカルシン; ミトクロミン; ミトフラキソン
 ; ミトギリル; ミトグアゾン; ミトマルシン; マイトマイシン C; マイトマイシン; ミト
 ナフィド; ミトキドン; ミトスペル; ミトタン; ミトキサントロン; ミトゾロミド; ミボ
 プリン; ミゾリビン; モファロテン; モピダモール; ムブリチニブ; ミコフェノール酸;
 フェンプロピオン酸ナンドロロン; ネダプラチン; ネルザラビン; ネモルビシン; ニトラ
 クリン; ノコダゾール; ノフェツモバブ; ノガラマイシン; ノラトレキセド; ノルトピキ
 サントロン; オクトレオチド; オブレレベキン; オルマプラチン; オルタタキセル; オテ
 ラシル; オキサリプラチン; オキシスラン; オキソフェナルシン; パクリタキセル; パミ
 ドロネート; パツピロン; ペガデマーズ; ペガスバルガーゼ; ペグフィルグラスチム; ペ
 ルデシン; ペリオマイシン; ペリトレキサール; ペメトレキセド; ペンタムスチン; ペン 30
 トスタチン; ペプロマイシン; ペルホスファミド; ペリホシン; ピコプラチン; ピナフィ
 ド; ピボプロマン; ピボスルファン; ピルフェニドン; ピロキサントロン; ピキサントロ
 ン; プレビトレキセド; プリカミシドミトラマイシン; プリカマイシン; プロメスタン;
 プロメスタン; ポルフィマーナトリウム; ポルフィマー; ポルフィロマイシン; プレドニ
 ムスチン; プロカルバジン; プロバミジン; プロスピジウム; プミテバ; ピューロマイシ
 ン; ピラゾフリン; キナクリン; ラニムスチン; ラスブリカーゼ; リボプリン; リトロス
 ルファン; リツキシマブ; ログレチミド; ロキニメックス; ルホクロモマイシン; サバル
 ビシン; サフィンゴール; サルグラモスチム; サトラプラチン; セブリプラチン; セムス
 チン; シムトラゼン; シゾフィラン; ソブゾキサン; ソラフェニブ; スパルホサート; ス
 パルホス酸; スパルソマイシン; スピロゲルマニウム; スピロムスチン; スピロプラチン 40
 ; スピロプラチン; スクアラミン; ストレプトニグリン; ストレプトバリシン; ストレプ
 トゾシン; スホスファミド; スロフェヌル; リンゴ酸スニチニブ; 6-チオグアニン (6
 -T G); タセジナリン; タルク; タリソマイシン; タリムスチン; タモキシフェン; タ
 リキダー; タウロムスチン; テコガラ; テガフル; テロキサントロン; テモボルフ
 イン; テモゾロミド; テニボシド/V M-26; テニボシド; テロキシロン; テストラク
 トン; チアミプリン; チオグアニン; チオテバ; チアミプリン; チアゾフリン; チロミソ
 ール; チロロン; チムコダル; チモナシク; チラバザミン; トピキサントロン; トポテ
 カン; トレミフェン; トシツモマブ; トラベクテジン (エクチナサイジン743); トラ
 スツズマブ; トレストロン; トレチノイン/A T R A; トリシリピン; トリロスタン; ト
 リメトレキセート; 四硝酸トリプラチン; トリプトレリン; トロホスファミド; ツプロゾ

10

20

30

40

50

ール；ウベニメクス；ウラシルマスタード；ウレデパ；バルルビシン；バルスポダル；パ
プレオチド；ベルテポルフィン；ビンブラスチン；ビンクリスチン；ビンデシン；ピネピ
ジン；ビンフルニン；ビンホルミド；ビングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロ
シン；ピノレルビン；ビンロシジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キ
サントマイシンA（グアメシクリン）；ゼニプラチン；ジラスコルブ〔2-H〕；ジノス
タチン；ゾレドロネート；ゾルビシン；およびゾスキダルなどの抗癌剤が挙げられる。

【0017】

本明細書において提供される、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療
する方法およびヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法のいずれにおいても、可
溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤は、例えば、経口的に、静脈内に（I V
）、皮下に、筋肉内に、腫瘍内に、皮内に、局所的に、経皮的に、直腸に、または表皮下
になど、局所的に投与しても、全身投与してもよい。本明細書において提供される方法の
特定の例では、可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤は、静脈内に投与され
る。その他の例では、可溶性ヒアルロニダーゼおよび／または第2の薬剤は、腫瘍内に投
与される。

【0018】

本明細書において、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療する方法お
よびヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法が提供される。いくつかの例では、
ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態は、高い間質液圧と関連している。さら
なる例では、本明細書において提供される方法によって治療される疾患または状態は、椎
間板圧迫、癌または浮腫である。浮腫は、例えば、臓器移植、卒中または脳外傷によって引
き起こされ得る。治療される疾患または状態が癌である例では、癌は、固形腫瘍などの腫
瘍であり得る。いくつかの例では、腫瘍は、同一組織種の非癌性組織と比較して、または
同一腫瘍種の非転移性腫瘍と比較して、ヒアルロナンの細胞発現および／または間質発現
が増大している。特定の例では、治療される疾患または状態は、後期癌、転移性癌および
／または未分化癌である。一例では、疾患または状態は、卵巣癌、*in situ*癌腫（*I S C*）、
扁平上皮癌（*S C C*）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、脳癌または
結腸癌である。本明細書において提供される方法のいくつかの例では、治療は、対象にお
ける腫瘍の大きさの減少を達成する。

【0019】

いくつかの実施形態では、提供される方法において使用される可溶性ヒアルロニダーゼ
は、それだけには限らないが、ヒツジ、マウス、サル、ウシ、細菌またはヒトPH20を
はじめとする可溶性PH20である。いくつかの例では、PH20の可溶型は、C末端G
P Iを除去するよう末端切断された可溶性PH20である。本明細書において提供される
方法のいくつかの態様では、可溶性ヒアルロニダーゼは、配列番号1に含まれるアミノ酸
の配列または配列番号1に含まれるアミノ酸の配列と少なくとも約91%のアミノ酸配列
同一性を有する配列を有し、それによって可溶性ヒアルロニダーゼは、可溶性で、N-グ
リコシル化され、中性で活性である。その他の例では、可溶性ヒアルロニダーゼは、アミ
ノ酸残基467～483であるか、またはアミノ酸残基467～483の間であるアミノ
酸残基で末端切断されている配列番号1に示されるアミノ酸の配列を含む。例えば、可溶
性ヒアルロニダーゼは、467、468、469、470、471、472、473、4
74、475、476、477、478、479、480、481、482および483
の中から選択されるアミノ酸残基で末端切断されている、配列番号1に示されるアミノ酸
の配列を含み得る。

【0020】

いくつかの態様では、本明細書において提供される方法において使用される可溶性ヒア
ルロニダーゼは、CHO細胞において分泌される。その他の態様では、可溶性ヒアルロニ
ダーゼは、配列番号1のアミノ酸36～467、36～468、36～469、36～4
70、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36
～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、

36～482もしくは36～483として示されるアミノ酸の配列を有するか、または配列番号1のアミノ酸36～467、36～468、36～469、36～470、36～471、36～472、36～473、36～474、36～475、36～476、36～477、36～478、36～479、36～480、36～481、36～482もしくは36～483として示されるアミノ酸の配列と少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性を有する。特定の例では、可溶性ヒアルロニダーゼは、配列番号4～9および46～48のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有するポリペプチドならびにその対立遺伝子変異体、種変異体およびその他の変異体の中から選択される。一実施形態では、可溶性ヒアルロニダーゼは、配列番号4に示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチドである。別の実施形態では、可溶性ヒアルロニダーゼは、配列番号4～9のいずれかに示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列によってコードされるポリペプチド (polypeptides) のの中から選択される。このような例では、可溶性ヒアルロニダーゼは、CHO細胞における発現によって産生され得る。例えば、一実施形態では、可溶性ヒアルロニダーゼは、指定されたrHuPH20である。さらに、いくつかの態様では、本明細書において提供される方法において使用される可溶性ヒアルロニダーゼは、グリコシル化されている。

【0021】

上記で論じたように、ヒアルロニダーゼ基質が蓄積する疾患または状態を治療するための、またはヒアルロナン関連疾患または状態を治療するための、本明細書において提供される方法では、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されているヒアルロニダーゼ酵素が対象に投与される。いくつかの例では、可溶性ヒアルロニダーゼとコンジュゲートしているポリマーは、ペグ化部分 (PEG)、例えば、メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (5 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (20 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジルブタノエート (mPEG-SBA) (30 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジル α -メチルブタノエート (mPEG-SMB) (20 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジル α -メチルブタノエート (mPEG-SMB) (30 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - ブチルアルデヒド (mPEG-ブチルアルデヒド) (30 kDa)、メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジルプロピオネート (mPEG-SPA) (20 kDa) ; メトキシーポリ (エチレングリコール) - スクシンイミジルプロピオネート (mPEG-SPA) (30 kDa) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (10 kDa、分岐) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (20 kDa、分岐) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (40 kDa、分岐) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (mPEG₂-NHS) (60 kDa、分岐) ; ビオチン-ポリ (エチレングリコール) - N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ビオチン-PEG-NHS) (5 kDa、ビオチン化) ; ポリ (エチレングリコール) - p-ニトロフェニルカルボネート (PEG-p-ニトロフェニルカルボネート) (30 kDa) ; またはポリ (エチレングリコール) - プリオピオンアルデヒド (PEG-プリオピオンアルデヒド) (30 kDa) などを含む。いくつかの態様では、PEGは、分岐または直鎖PEGである。特定の例では、PEGは、メトキシーPEG (mPEG)、または例えば、メトキシポリ (エチレングリコール) ブタン酸の直鎖N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルである。このようPEGは、30または約30キロダルトンの分子量を有し得る。

【0022】

本明細書において、少なくとも3 U/mLのレベルで血漿中のヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも1週間維持するのに十分な量で可溶性ヒアルロニダーゼを含有す

る組成物が提供され、可溶性ヒアルロニダーゼは、ポリマーとコンジュゲートしている。いくつかの態様では、血漿中のヒアルロニダーゼのレベルは、少なくともまたは約 $3 \text{ U/mL} \sim 12 \text{ U/mL}$ である。ヒアルロニダーゼとコンジュゲートしている例示的ポリマーとして、それだけには限らないが、シアル化およびペグ化部分が挙げられる。組成物は、1週間に少なくとも2回、少なくとも1週間を超えて投与してもよい。いくつかの例では、組成物は、少なくともまたは約 $2.0 \text{ mg} \sim 60 \text{ mg}$ のポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを含み、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼは、少なくともまたは約 $20,000 \text{ U/mg}$ 、 $25,000 \text{ U/mg}$ 、 $30,000 \text{ U/mg}$ 、 $31,000 \text{ U/mg}$ 、 $32,000 \text{ U/mg}$ 、 $33,000 \text{ U/mg}$ 、 $34,000 \text{ U/mg}$ 、 $35,000 \text{ U/mg}$ 、 $36,000 \text{ U/mg}$ 、 $37,000 \text{ U/mg}$ 、 $38,000 \text{ U/mg}$ 、 $39,000 \text{ U/mg}$ 、 $40,000 \text{ U/mg}$ 、 $45,000 \text{ U/mg}$ 、 $50,000 \text{ U/mg}$ 、 $55,000 \text{ U/mg}$ 、 $60,000 \text{ U/mg}$ またはそれ以上の比活性を有する。さらに、いくつかの態様では、組成物は、投与あたり少なくとも 10 mL である。

【0023】

本明細書において提供される組成物は、経口的に、静脈内に（IV）、皮下に、筋肉内に、腫瘍内に、皮内に、局所的に、経皮的に、直腸性に、または表皮下に投与するために処方できる。一例では、組成物は、静脈内投与のために処方される。本明細書において提供される組成物はまた、ヒスチジンおよび／または NaCl を含み得る。例えば、一実施形態では、組成物は、 10 mM または約 10 mM のヒスチジンおよび／または 130 mM

NaCl を用いて処方される。組成物は、 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 または 7.2 であるまたは約 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 または 7.2 である pH を有し得る。一例では、組成物は、 6.5 または約 6.5 の pH を有する。

【0024】

少なくとも 3 U/mL のレベルで血漿におけるヒアルロニダーゼ酵素の血漿レベルを少なくとも1週間維持するのに十分な量で可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物（ここで、可溶性ヒアルロニダーゼは、ポリマーとコンジュゲートしている）と、ヒアルロニタン関連疾患または状態を治療するための薬剤を含有する第2の組成物とを含有する組合せが、本明細書において提供される。いくつかの例では、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物は、1週間に少なくとも2回、少なくとも1週間を超えて投与されるためのものである。さらなる態様では、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物は、少なくとも、または約 $2.0 \text{ mg} \sim 60 \text{ mg}$ の、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼを含み；ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼは、少なくとも、または約 $20,000 \text{ U/mg}$ 、 $25,000 \text{ U/mg}$ 、 $30,000 \text{ U/mg}$ 、 $31,000 \text{ U/mg}$ 、 $32,000 \text{ U/mg}$ 、 $33,000 \text{ U/mg}$ 、 $34,000 \text{ U/mg}$ 、 $35,000 \text{ U/mg}$ 、 $36,000 \text{ U/mg}$ 、 $37,000 \text{ U/mg}$ 、 $38,000 \text{ U/mg}$ 、 $39,000 \text{ U/mg}$ 、 $40,000 \text{ U/mg}$ 、 $45,000 \text{ U/mg}$ 、 $50,000 \text{ U/mg}$ 、 $55,000 \text{ U/mg}$ 、 $60,000 \text{ U/mg}$ またはそれ以上の比活性を有する。

【0025】

本明細書において提供される組合せの第1および第2の組成物は、同時に処方されるか、または別個に提供される。いくつかの例では、本明細書において提供される組合せ中のヒアルロニダーゼとコンジュゲートしているポリマーは、シアル化またはペグ化部分である。さらなる実施形態では、組合せ中の第2の薬剤は、抗癌剤または例えば、化学療法薬、放射線療法、抗体、ペプチド、遺伝子療法ベクター、ウイルスまたは核酸などの治療である。特定の例では、第2の薬剤は、アシビシン；アクラルビシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アテムツズマブ；アリトレチノイン（ $9-\text{Cis}$ -レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；

アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；
 アナストロゾール；アナキシロン；アンシタビン；アントラマイシン；アパジコン；アル
 ギメスナ；ヒ素三酸化物；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチ
 ジン；アゼテパ；アゾトマイシン；パノキサントロン；パタブリン；パチマスタット；生
 B C G；ベナキシピン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビ
 カルタミド；ビエタセルピン；ビリコダル；ビスアントレン；ビスアントレン；ビスナフィド
 ジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン
 ；ブドチタン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カペシ
 タビン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリ
 フェプロザンを伴うカルムスチン；カルムスチン；カルビシン；カルゼレシン；セデフィ
 ンゴール；セレコキシブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン
 ；シスプラチン；クラドリビン；クランフェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シ
 クロホスファミド；リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイ
 シン；ダルベポエチン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシ
 ン；ダウノルビシン；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デ
 キソナプラチン；デクスラゾキサン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスピジウム；ジ
 エノゲスト；ジナリン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン
 ；リボソーム型ドキソルビシン；ドキソルビシンH C L；ドコルビシンH C Lリボソーム
 注射剤；ドキソルビシン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾ
 マイシン；エコムスチン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラク
 リダル；エリナフィド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラ
 チン；エンプロメート；エンザスタウリン；エピプロピジン；エピルビシン；エポエチン
 α ；エプタロプロスト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾ
 ール；エトグルシド；リン酸エトボシド；エトボシドV P－16；エトボシド；エトプリ
 ン；エキセメスタン；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド
 ；フィルグラスチム；フロクスウリジン；フルダラビン；フルオロウラシル；5－フルオ
 ロウラシル；フルオキシメステロン；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシン；ホ
 ストリエシン；ホトレタミン；フルベストラント；ガラルビシン；ガロシタビン；ゲムシ
 タビン；ゲムツズマブ／オゾガマイシン；ゲロキノール；ギマテカン；ギメラシル；グロ
 キサゾン；グルホスファミド；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ／チウ
 キセタン；イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；イロマスタット；メシル酸イ
 マチニブ；イメキソン；インプロスルファン；インジスラム；インプロコン；インターフ
 エロン α 2 a；インターフェロン α 2 b；インターフェロン α ；インターフェロン β ；イ
 ンターフェロン γ ；インターフェロン；インターロイキン2および他のインターロイキン
 （組換えインターロイキンを含む）；イントプリシン；ヨーベングアン〔131－I〕；
 イプロプラチン；イリノテカン；イルソグラジン；イクサベピロン；ケトトレキサート；
 L－アラノシン；ランレオチド；ラパチニブ；レドキサントロン；レトロゾール；ロイコ
 ボリン；リユープロリド；リユープロレリン（リユープロレリド）；レバミソール；レキ
 サカルシトール；リアロゾール；ロバプラチン；ロメトレキソール；ロムスチン／C C N
 U；ロムスチン；ロナファルニブ；ロソキサントロン；ルルトテカン；マホスファミド；
 マンノスルファン；マリマスタット；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン；
 メクロレタミン／ナイトロジェンマスタード；酢酸メゲストロール；メゲストロール；メ
 レンゲストロール；メルファラン；メルファランI L－P A M；メノガリル；メピチオス
 タン；メルカプトプリン；6－メルカプトプリン；メスナ；メテシンド；メトトレキサ
 ート；メトキサレン；メトミダート；メトプリン；メツレデバ；ミボプラチン；ミプロキシ
 フェン；ミソニダゾール；ミチンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトフラキソン
 ；ミトギリル；ミトグアゾン；ミトマルシン；マイトマイシンC；マイトマイシン；ミト
 ナフィド；ミトキドン；ミトスペル；ミトタン；ミトキサントロン；ミトゾロミド；ミボ
 プリン；ミゾリビン；モファロテン；モピダモール；ムブリチニブ；ミコフェノール酸；
 フェンプロピオン酸ナンドロロン；ネダプラチン；ネルザラビン；ネモルビシン；ニトラ

10

20

30

40

50

クリン；ノコダゾール；ノフェツモバブ；ノガラマイシン；ノラトレキセド；ノルトピキ
 サントロン；オクトレオチド；オブレルベキン；オルマブラチン；オルタタキセル；オテ
 ラシル；オキサリプラチン；オキシスラン；オキシフェナルシン；パクリタキセル；パミ
 ドロネート；パツピロン；ペガデマーズ；ペガスパルガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペ
 ルデシン；ペリオマイシン；ペリトレキソール；ペメトレキセド；ペンタムスチン；ペン
 トスタチン；ペプロマイシン；ペルホスファミド；ペリホシン；ピコプラチン；ピナフィ
 ド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピルフェニドン；ピロキサントロン；ピキサントロ
 ン；プレビトレキセド；プリカミシドミトラマイシン；プリカマイシン；プロメスタン；
 プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィマー；ポルフィロマイシン；プレドニ
 ムスチン；プロカルバジン；プロバミジン；プロスピジウム；プミテパ；ピューロマイシ
 ン；ピラゾフリン；キナクリン；ラニムスチン；ラスブリカーゼ；リボプリン；リトロス
 ルファン；リツキシマブ；ログレチミド；ロキニメックス；ルホクロモマイシン；サバル
 ビシン；サフィンゴール；サルグラモスチム；サトラプラチン；セブリプラチン；セムス
 チン；シムトラゼン；シゾフィラン；ソブゾキサン；ソラフェニブ；スパルホサート；ス
 パルホス酸；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン
 ；スピロプラチン；スクアラミン；ストレプトニグリン；ストレプトバリシン；ストレプ
 トゾシン；スホスファミド；スロフェヌル；リンゴ酸スニチニブ；6-チオグアニン（6
 -TG）；タセジナリン；タルク；タリソマイシン；タリムスチン；タモキシフェン；タ
 リキダー；タウロムスチン；テコガラン；テガフル；テロキサントロン；テモボルフ
 ィン；テモゾロミド；テニボシド／VM-26；テニボシド；テロキシロン；テストラク
 トン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアミプリン；チアゾフリン；チロミソ
 ール；チロロン；チムコダル；チモナシク；チラパザミン；トピキサントロン；トポテ
 カン；トレミフェン；トシツモマブ；トラベクテジン（エクチナサイジン743）；トラ
 スツズマブ；トレストロン；トレチノイン／ATRA；トリシリピン；トリロスタン；ト
 リメトレキセート；四硝酸トリプラチン；トリプトレリン；トロホスファミド；ツプロゾ
 ール；ウベニメクス；ウラシルマスタード；ウレデバ；バルルビシン；バルスポダル；バ
 プレオチド；ベルテポルフィン；ビンブラスチン；ビンクリスチン；ビンデシン；ビネピ
 ジン；ビンフルニン；ビンホルミド；ビングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロ
 シン；ビノレルビン；ビンロシジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キ
 サントマイシンA（グアメシクリン）；ゼニプラチン；ジラスコルブ〔2-H〕；ジノス
 タチン；ゾレドロネート；ゾルビシン；およびゾスキダルの中から選択される抗癌剤であ
 る。

10

20

30

【0026】

一方法では、修飾されたヒアルロナン分解酵素を含有する組成物が、ヒアルロナン関連
 疾患または状態を有する、またはこのような疾患または状態を有し得る対象に投与され、
 続いて、疾患または状態を治療するための第2の、異なる薬剤または治療が投与される。
 第2の薬剤または治療は、ヒアルロナン分解酵素の投与後、24時間を超えて投与される。
 投与は、静脈内に、経口的に、皮下に、または筋肉内になど、任意の適した経路によっ
 て、全身的に達成しても、局所的に達成してもよい。

【0027】

対象においてヒアルロナン関連疾患または状態を治療するための別の方法では、修飾さ
 れたヒアルロナン分解酵素を含有する組成物は、ヒアルロナン関連疾患または状態を有す
 るか、またはこのような疾患または状態を有し得る対象に全身的に投与される。修飾され
 たヒアルロナン分解酵素は、少なくとも、24時間を超えて間質液圧を低下させるのに有
 効である量で投与される。ヒアルロナン分解酵素の投与によって、疾患または状態を治療
 でき、第2の薬剤または治療を続ける、または投与することができる。投与は、例えば、
 腫瘍内にをはじめとして、静脈内に、経口的に、皮下に、または筋肉内に達成できる。

【0028】

また、対象に、有効量の、修飾されているヒアルロナン分解酵素を含有する組成物を投
 与することによって、対象において間質液圧を低下させる方法も提供される。ヒアルロナ

40

50

ン分解酵素のこの量は、間質液圧を24時間を超えて低下させ；ヒアルロナン分解酵素のこの量は、10ユニット～1,000,000ヒアルロニダーゼユニットもしくは約10ユニット～1,000,000ヒアルロニダーゼユニット、例えば、10～50,000,000ユニットもしくは約10～50,000,000ユニット、10～40,000,000ユニット、10～36,000,000ユニット、10～12,000,000ユニット、10～1,200,000ユニット、10～1,000,000ユニット、10～500,000ユニット、100～100,000ユニット、500～50,000ユニット、1000～10,000ユニット、5000～7500ユニット、5000ユニット～50,000ユニット、または1,000～10,000ユニットの間と機能的に同等である。ユニットは、通常、修飾されていないヒアルロニダーゼを参照して測定される。間質圧を低下させることは、対象におけるヒアルロナン関連疾患または状態の治療を達成し得る。

10

【0029】

本明細書における方法のいずれかの実施では、対象由来のサンプルにおけるヒアルロナン発現は、治療に先立って、治療の間または治療後に測定（評価またはモニタリング）できる。必要に応じて、対象由来のサンプルにおけるヒアルロナンの発現を、対照サンプルにおける発現と、または標準と比較することができる。従って、例えば、対象由来のサンプルにおけるヒアルロナン発現を最初に測定すること、次いで、対象に修飾されたヒアルロナン分解酵素を含有する組成物を投与することによって対象においてヒアルロナン関連疾患または状態を治療する方法が提供される。投与は、それだけには限らないが、経口的に、静脈内に（IV）、皮下に、筋肉内に、腫瘍内に、皮内に、局所的に、経皮的に、経口的に、直腸に、または表皮下になどの局所投与および全身投与を含む。サンプルは、例えば、それだけには限らないが、血液サンプル、腫瘍生検、脳脊髄液、尿、汗、精液または唾液サンプルなどの組織または体液である。

20

【0030】

本方法は、ヒアルロナン分解酵素以外であり、特定の疾患の治療のために使用される、第2の薬剤または治療を投与することによって実施できる。例えば、疾患が腫瘍である場合は、第2の薬剤は、化学療法薬およびまたは放射線照射プロトコール／療法であり得る。例示的な第2の薬剤は、抗癌剤である。

【0031】

第2の薬剤が薬物または組成物である場合は、第2の薬剤およびヒアルロニダーゼを、別個に投与してもよく、単一組成物中で一緒に、または2種の組成物で同時に、または断続的に、または逐次、またはそのいずれかの組合せで投与してもよい。通常、ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物は、第2の薬剤の投与に先立って投与される。いくつかの実施形態では、第2の薬剤または治療は、ヒアルロニダーゼ含有組成物の前に達成または投与され得る。本明細書において、時間が24時間を超えるものである必要がない方法では、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物と、第2の薬剤または治療の投与間のタイミングは、先立って（または続いて）30秒または60秒、少なくとも1分、少なくとも5分、少なくとも15分、少なくとも30分、少なくとも1時間内であり得る、または1時間を超え得る。時間差は、第2の薬剤または治療の投与に先立って、最小または2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間、48時間または72時間であり得る。

40

【0032】

例示的な第2の薬剤および治療として、例えば、化学療法薬である抗癌剤、放射線療法、抗体、ペプチド、遺伝子療法ベクター、腫瘍退縮性ウイルスなどのウイルス、および抗癌タンパク質またはその他の治療タンパク質をデリバリーする遺伝子療法ベクターなどの核酸が挙げられる。その他の例示的な第2の薬剤または治療として、それだけには限らないが、鎮痛薬、抗炎症薬、抗菌薬、殺アメーバ剤（amoebicidal agent）、殺トリコモナス剤（trichomonocidal agent）、抗パーキンソン病薬、抗マラリア薬、抗痙攣薬、抗うつ薬、抗関節炎薬、抗真菌薬、抗高血圧薬、解熱

50

剤、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン薬、 α -アドレナリン作動性アゴニスト剤、 α 遮断薬、麻酔薬、気管支拡張剤、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、 β アドレナリン作動性遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、心血管薬物、避妊薬、化粧剤または審美剤、鬱血除去薬、利尿薬、抑制薬、診断薬、治療用抗体、電解質物質、催眠薬、ホルモン剤、血糖上昇剤、筋弛緩剤、筋肉収縮剤、眼科用剤、副交感神経作動薬、精神賦活剤、鎮静剤、睡眠誘導物質、交感神経作用剤、トランクライザー剤、泌尿器剤、腔剤、抗ウイルス剤、ビタミン剤、非ステロイド系抗炎症薬およびアンジオテンシン変換酵素阻害剤が挙げられる。このような薬剤の例示的なものとして、アシビシン；アクラルビシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アテムツズマブ；アリトレチノイン（9-C i s-レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アナキシロン；アンシタビン；アントラマイシン；アバジコン；アルギメスナ；ヒ素三酸化物；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バノキサントロン；バタブリン；バチマスタット；生BCG；ベナキシピン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビカルタミド；ビエタセルピン；ピリコダル；ピサントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン；ブドチタン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カペシタビン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリフェプロザンを伴うカルムスチン；カルムスチン；カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；セレコキシブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリピン；クランフェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シクロホスファミド；リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダルベポエチン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシン；ダウノルビシン；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デキソナプラチン；デクスラゾキササン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスビジウム；ジエノゲスト；ジナリン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン；リボソーム型ドキソルビシン；ドキソルビシンHCL；ドコルビシンHCLリボソーム注射剤；ドキソルビシン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エコムスチン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラクリダル；エリナフィド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラチン；エンプロメート；エンザスタウリン；エピプロピジン；エピルビシン；エポエチン α ；エプタロプロスト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾール；エトグルシド；リン酸エトポシド；エトポシドVP-16；エトポシド；エトプリン；エキセメスタン；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フロクスウリジン；フルダラビン；フルオロウラシル；5-フルオロウラシル；フルオキシメステロン；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシン；ホストリエシン；ホトレタミン；フルベストラント；ガラルビシン；ガロシタビン；ゲムシタビン；ゲムツズマブ／オゾガマイシン；ゲロキノール；ギマテカン；ギメラシル；グロキサゾン；グルホスファミド；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ／チウキセタン；イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；イロマスタット；メシル酸イマチニブ；イメキソン；インプロスルファン；インジスラム；インプロコン；インターフェロン α 2a；インターフェロン α 2b；インターフェロン α ；インターフェロン β ；インターフェロン γ ；インターフェロン；インターロイキン2および他のインターロイキン（組換えインターロイキンを含む）；イントプリシン；ヨーベングアン[131-I]；イブロプラチン；イリノテカン；イルソグラジン；イクサベピロン；ケトトレキサート；L-アラノシン；ランレオチド；ラパチニブ；レドキサントロン；レトロゾール；ロイコボリン；リユープロリド；リユープロレリン（リユープロレリド）；レバミソール；レキサカルシトール；リアロゾール；ロバプラチン；ロメトレキソール；ロムスチン／CCNU；ロムスチン；ロナファルニブ；ロソキサントロン；ルルトテカン；マホスファミド；マンノスルファン；マリマス

10

20

30

40

50

タット；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン；メクロレタミン／ナイトロジ
 エンマスタード；酢酸メゲストロール；メゲストロール；メレンゲストロール；メルファ
 ラン；メルファラン I L - P A M；メノガリル；メピチオスタン；メルカプトプリン；6
 -メルカプトプリン；メスナ；メテシンド；メトトレキサート；メトキサレン；メトミダ
 ート；メトプリン；メツレデバ；ミボプラチン；ミプロキシフェン；ミソニダゾール；ミ
 チンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトフラキソン；ミトギリソ；ミトグアゾン
 ；ミトマルシン；マイトマイシン C；マイトマイシン；ミトナフィド；ミトキドン；ミト
 スペル；ミトタン；ミトキサントロン；ミトゾロミド；ミボプリン；ミゾリピン；モファ
 ロテン；モピダモール；ムブリチニブ；ミコフェノール酸；フェンプロピオン酸ナンドロ
 ロン；ネダプラチン；ネルザラビン；ネモルビシン；ニトラクリン；ノコダゾール；ノフ
 ェツモバブ；ノガラマイシン；ノラトレキセド；ノルトピキサントロン；オクトレオチド
 ；オペレルベキン；オルマプラチン；オルタタキセル；オテラシル；オキサリプラチン；
 オキシスラン；オキシフェナルシン；パクリタキセル；パミドロネート；パツピロン；ペ
 ガデマーゼ；ペガスバルガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペルデシン；ペリオマイシン；
 ペリトレキサール；ペメトレキセド；ペンタムスチン；ペントスタチン；ペプロマイシン
 ；ペルホスファミド；ペリホシン；ピコプラチン；ピナフィド；ピボプロマン；ピボスル
 ファン；ピルフェニドン；ピロキサントロン；ピキサントロン；プレビトレキセド；プリ
 カミシドミトラマイシン；プリカマイシン；プロメスタン；プロメスタン；ポルフィマー
 ナトリウム；ポルフィマー；ポルフィロマイシン；ブレドニムスチン；プロカルバジン；
 プロパミジン；プロスピジウム；プミテバ；ピューロマイシン；ピラゾフリン；キナクリ
 ン；ラニムスチン；ラスブリカーゼ；リボプリン；リトロスルファン；リツキシマブ；ロ
 グレチミド；ロキニメックス；ルホクロモマイシン；サバルビシン；サフィンゴール；サ
 ルグラモスチム；サトラプラチン；セブリプラチン；セムスチン；シムトラゼン；シゾフ
 ィラン；ソブゾキサン；ソラフェニブ；スパルホサート；スパルホス酸；スパルソマイシ
 ン；スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；スピロプラチン；スクアラ
 ミン；ストレプトニグリン；ストレプトバリシン；ストレプトゾシン；スホスファミド；
 スロフェヌル；リンゴ酸スニチニブ；6 -チオグアニン（6 -T G）；タセジナリン；タ
 ルク；タリソマイシン；タリムスチン；タモキシフェン；タリキダー；タウロムスチン
 ；テコガラン；テガフル；テロキサントロン；テモボルフィン；テモゾロミド；テニボ
 シド／V M - 2 6；テニボシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグ
 アニン；チオテバ；チアミプリン；チアゾフリン；チロミソール；チロロン；チムコダル
 ；チモナシク；チラパザミン；トピキサントロン；トポテカン；トレミフェン；トシツ
 モマブ；トラベクテジン（エクチナサイジン 7 4 3）；トラスツズマブ；トレストロン；
 トレチノイン／A T R A；トリシリピン；トリロスタン；トリメトレキセート；四硝酸ト
 リプラチン；トリプトレリン；トロホスファミド；ツプロゾール；ウベニメクス；ウラシ
 ルマスタード；ウレデバ；バルルビシン；バルスポダル；バプレオチド；ベルテボルフィ
 ン；ピンブラスチン；ピンクリスチン；ビンデシン；ビネピジン；ビンフルニン；ビンホ
 ルミド；ビングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロシン；ビノレルピン；ビンロ
 シジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キサントマイシン A（グアメシ
 クリン）；ゼニプラチン；ジラスコルブ〔2 -H〕；ジノスタチン；ゾレドロネート；ゾ
 ルビシン；およびゾスキダルがある。

【0033】

ヒアルロナン関連疾患または状態として、例えば、高い間質液圧と関連している、また
 は含む疾患または状態、例えば、椎間板圧迫、癌および浮腫が挙げられる。浮腫は、例え
 ば、臓器移植、卒中または脳外傷に起因し得る、またはそれで現れる。癌は、固形腫瘍お
 よびリンパ性／血液腫瘍および転移性疾患ならびに未分化腫瘍を含む。治療に適している
 腫瘍は、通常、同一組織種の非癌性組織と比較して、または同一腫瘍種の非転移性腫瘍と
 比較して、ヒアルロナンの細胞性発現および／または間質性発現を示す。癌として、任意
 の 1 種以上の卵巣癌、i n s i t u 癌（I S C）、扁平上皮癌（S C C）、前立腺癌、
 膵臓癌、その他の胃癌、非小細胞肺癌、乳癌、脳癌および結腸癌のいずれかが挙げられる

。

【0034】

記載したように、本明細書における方法、組成物および組合せにおいて使用するためのヒアルロナン分解酵素として、可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、非ヒト動物ヒアルロニダーゼ、細菌ヒアルロニダーゼおよびヒトヒアルロニダーゼが挙げられる。可溶性ヒアルロニダーゼの例示的なものとして、PH20、例えば、ヒツジ、ウシおよびヒトPH20の可溶性活性部分がある。ヒトPH20などのPH20を可溶性にするには、C末端GP Iアンカー付着シグナル配列を除去するようPH20を末端切断する。ヒトPH20に関しては、末端切断は、残基467～482のいずれかまたはヒトにおける配列番号1の残基467～482のいずれかに対応するもの、対立遺伝子変異体または種変異体またはその他の変異体で終わる。例えば、ヒアルロナン分解酵素は、配列番号4～9および47～48のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有するポリペプチドならびにその対立遺伝子変異体、種変異体およびその他の変異体の中から選択され得る。ヒアルロナン分解酵素は、配列番号3または配列番号4～9および47～48のいずれかに示されるアミノ酸の配列をコードする核酸の配列、例えば、配列番号49に示される核酸の配列によってコードされるものであり得る。それらは、このようなアミノ酸の配列を有するヒアルロナン分解酵素であり得る。ヒアルロナン分解酵素は、その他の変異体の中から選択される。その他の変異体は、ポリペプチドが可溶性であり、本明細書に記載される方法をはじめとする当業者に公知の方法によって評価できるヒアルロニダーゼ活性を示す（すなわち、ヒアルロナンを分解できる）限り、配列番号1、4～9および47～48に示されるものに由来するアミノ酸の隣接配列に対して、その全長に沿って、少なくとも60%、65、70、75、80、85、88%、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドの中から選択される。

【0035】

特に、ヒアルロナン分解酵素は、ヒトPH20可溶性ヒアルロニダーゼのアミノ酸1～482または36～482（すなわち、配列番号1に示されるような）をコードする核酸分子またはその対立遺伝子またはその他の変異体の発現によって産生されるポリペプチドであり得る。発現は、CHO細胞などの細胞における発現および分泌を含み得る。例えば、組成物は、指定された組換えヒトPH20（rHuPH20）であり、これは、分泌のためのシグナル配列をコードする核酸、例えば、CHO細胞におけるアミノ酸1～35と連結している、アミノ酸36～482をコードする核酸の発現によって産生される。rHuPH20は、培地から単離される。単離後、1以上のペグ化部分（PEG）またはその他のポリマーとの反応などによって修飾される。その他のヒアルロナン分解酵素は、同様に修飾され得、組換え発現によって産生されるか、または天然供給源から単離され得る。このような方法および製品は、当業者に公知である。

【0036】

ヒアルロナン分解酵素の修飾のための例示的ポリマーとして、それだけには限らないが、メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジルブタノエート（mPEG-SBA）（5kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジルブタノエート（mPEG-SBA）（20kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジルブタノエート（mPEG-SBA）（30kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジル α -メチルブタノエート（mPEG-SMB）（20kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジル α -メチルブタノエート（mPEG-SMB）（30kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-ブチルアルデヒド（mPEG-ブチルアルデヒド）（30kDa）、メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジルプロピオネート（mPEG-SPA）（20kDa）；メトキシーポリ（エチレングリコール）-スクシンイミジルプロピオネート（mPEG-SPA）（30kDa）；（メトキシーポリ（エチレングリコール））₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（mPEG₂-NHS）（10kDa、分岐）；（メトキシーポリ（エチレングリコール））₂-N-ヒドロキシスクシンイミドエステ

ル (m P E G₂ - N H S) (20 k D a、分岐) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (m P E G₂ - N H S) (40 k D a、分岐) ; (メトキシーポリ (エチレングリコール))₂ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (m P E G₂ - N H S) (60 k D a、分岐) ; ビオチン-ポリ (エチレングリコール) - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (ビオチン- P E G - N H S) (5 k D a、ビオチン化) ; ポリ (エチレングリコール) - p - ニトロフェニルカルボネート (P E G - p - ニトロフェニル-カルボネート) (30 k D a) ; およびポリ (エチレングリコール) - プリオピオンアルデヒド (P E G - プロピオンアルデヒド) (30 k D a) が挙げられる。

【0037】

P E G 部分は、よく知られており、市販されているものまたは合成できるものが挙げられる。P E G 部分は、分岐 P E G であっても、直鎖 P E G であってもよく、例えば、メトキシーポリ (エチレングリコール) ブタン酸の直鎖 N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルをはじめとするメトキシー P E G (m P E G) であってもよい。P E G の分子量は、適したどんなものであってもよく、例えば、30 または約 30 キロダルトンであってもよい。

【0038】

ヒアルロナン分解酵素が修飾されている場合は、比活性は、低減され得る。補償するために、より多量 (重量) の修飾された種が使用される。例えば、P E G 化 r H u P H 20 の比活性は、天然 r H u P H 20 の比活性より 2 倍もしくは 3 倍もしくは 4 倍少ない、または約 2 倍もしくは 3 倍もしくは 4 倍少ないものであり得る。投与量は、所望のユニットをデリバリーするよう相応に調整される。投与量は、疾患または状態および特定のヒアルロナン分解酵素、例えば、特定のヒアルロニダーゼ、およびその修飾に応じて変わる。一般的な投与量は、10 ~ 50,000,000 ユニット、10 ~ 40,000,000 ユニット、10 ~ 36,000,000 ユニット、10 ~ 12,000,000 ユニット、10 ~ 1,200,000 ユニット、10 ~ 1,000,000 ユニット、10 ~ 500,000 ユニット、100 ~ 100,000 ユニット、500 ~ 50,000 ユニット、1000 ~ 10,000 ユニット、5000 ~ 7500 ユニット、5000 ユニット ~ 50,000 ユニット、もしくは 1,000 ~ 10,000 ユニットの、または約 10 ~ 50,000,000 ユニット、10 ~ 40,000,000 ユニット、10 ~ 36,000,000 ユニット、10 ~ 12,000,000 ユニット、10 ~ 1,200,000 ユニット、10 ~ 1,000,000 ユニット、10 ~ 500,000 ユニット、100 ~ 100,000 ユニット、500 ~ 50,000 ユニット、1000 ~ 10,000 ユニット、5000 ~ 7500 ユニット、5000 ユニット ~ 50,000 ユニット、もしくは 1,000 ~ 10,000 または約 10 ~ 50,000,000 ヒアルロニダーゼ ユニット、10 ~ 40,000,000 ユニット、10 ~ 36,000,000 ユニット、10 ~ 12,000,000 ユニット、10 ~ 1,200,000 ユニット、10 ~ 1,000,000 ユニット、10 ~ 500,000 ユニット、100 ~ 100,000 ユニット、500 ~ 50,000 ユニット、1000 ~ 10,000 ユニット、5000 ~ 7500 ユニット、5000 ユニット ~ 50,000 ユニット、もしくは 1,000 ~ 10,000 のヒアルロニダーゼ ユニットと機能的に同等である。このような投与量は、対象の組織における間質液圧の少なくとも 25 %、約 25 %、50 % または約 50 % の低減を達成し、これが、投与後、約 1 もしくは 2 時間または 1 もしくは 2 時間を超えて

10

20

30

40

50

、または少なくとも8時間もしくは少なくとも約8時間、少なくとも24時間もしくは少なくとも約24時間、または少なくとも48時間もしくは少なくとも約48時間、または少なくとも72時間もしくは少なくとも約72時間維持され得るよう選択されるか、または使用され得る。

【0039】

修飾されたヒアルロニダーゼ組成物などの修飾されたヒアルロナン分解酵素組成物の投与は、腫瘍中などの血管容積の変化を達成し得る。このような変化は、対象における組織の血管容積の少なくとも2倍もしくは約2倍または少なくとも3倍もしくは約3倍の増大であり得る。ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物の投与は、対象の組織における水分含量の少なくとも25%もしくは約25%または少なくとも50%もしくは約50%の低減を達成し得る。これらの変化は、ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物の投与後少なくとも8時間もしくは約8時間、少なくとも24時間もしくは約24時間、少なくとも48時間もしくは約48時間、または少なくとも72時間もしくは約72時間維持され、または現れ得る。

【0040】

ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物の投与によって、対象の組織におけるヒアルロナン陽性細胞のパーセンテージの減少を達成できる。ヒアルロナン陽性細胞は、固形腫瘍などの腫瘍中に生じ得る。治療は、対象において腫瘍の大きさの低減を達成できる。

【0041】

ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物の投与は、対象の血液におけるヒアルロニダーゼ活性として現れるおよび／または観察できる。対象の血液におけるヒアルロニダーゼの半減期は、少なくとも1もしくは約1、5もしくは約5、8もしくは約8、10もしくは約10、15もしくは約15、24もしくは約24、48もしくは約48、または72もしくは約72時間である。例えば、ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物の投与が、対象の血液におけるヒアルロニダーゼ活性をもたらず場合には、対象から得られる1ミリリットルの血漿は、患者に投与された総ヒアルロニダーゼ活性の少なくとも5%または約5%を、少なくとも1もしくは約1、5もしくは約5、8もしくは約8、10もしくは約10、15もしくは約15、24もしくは約24、48もしくは約48、または72もしくは約72時間有する。

【0042】

また、間質液圧を低下させるための、有効量のヒアルロナン分解酵素を含有し、この量が間質液圧を24時間を超えて低下させ、ヒアルロナン分解酵素の量が、10~1,000,000、約10~50,000,000ユニット、10~40,000,000ユニット、10~36,000,000ユニット、10~12,000,000ユニット、10~1,200,000ユニット、10~1,000,000ユニット、10~500,000ユニット、100~100,000ユニット、500~50,000ユニット、1000~10,000ユニット、5000~7500ユニット、5000ユニット~50,000ユニット、または1,000~10,000ヒアルロニダーゼの間、または約10~1,000,000、約10~50,000,000ユニット、10~40,000,000ユニット、10~36,000,000ユニット、10~12,000,000ユニット、10~1,200,000ユニット、10~1,000,000ユニット、10~500,000ユニット、100~100,000ユニット、500~50,000ユニット、1000~10,000ユニット、5000~7500ユニット、5000ユニット~50,000ユニット、または1,000~10,000ヒアルロニダーゼの間と機能的に同等である第1の組成物と；ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するための薬剤を含有する第2の組成物とを含む組合せも提供される。

【0043】

ヒアルロナン分解酵素は、ポリマー、例えば、ヒアルロニダーゼの半減期を増大するもののとのコンジュゲーションによって修飾される。例示的ポリマーとして、デキストラン、シアル化またはペグ化部分および／またはその組合せが挙げられる。ヒアルロナン分解酵

素は、可溶性ヒアルロニダーゼであり得、これとして、上記の非ヒト動物ヒアルロニダーゼ、ヒトヒアルロニダーゼおよび細菌ヒアルロニダーゼの中から選択されるものが挙げられ、本方法において使用するための上記のPH20の可溶性型である可溶性ヒアルロニダーゼを含む。第2の薬剤または治療は、本方法において使用するための上記で示されるもののいずれも含む。

【0044】

本明細書における方法によって、癌およびヒアルロナンを含むプロテオグリカンの豊富な細胞周囲マトリックスを含むその他の疾患が治療される。このような癌およびその他の疾患が、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼおよび本明細書において記載される（上記および下記）その他の薬剤を用いる治療に適している。本明細書に詳述されるように、PEG化rHuPH20のような修飾されたヒアルロナン分解酵素との接触は、細胞周囲コートの崩壊をもたらす。例示されるように、PEG化rHuPH20（PEG rHuPH20）は、用量依存的に腫瘍IFPを低下させ、IV投与後にIFPの85%を超える低下を達成した。腫瘍周囲HAは、PEG rHuPH20の単回用量後3日にわたって枯渇したままであった。腫瘍細胞の周囲の細胞周囲ヒアルロナンの組織学的崩壊とともに、腫瘍水分含量が3日にわたって大幅に減少したが、これは見かけの拡散係数（ADC）MRIおよびIFPモニタリングによって腫瘍において検出された変化と一致する。さらに、例示されるように腫瘍血管容積の3.5倍の選択的増大が、腫瘍内の血管の血管除圧の結果として、投薬後8時間内に達成された。これは、組織診断および超音波によって確認された。腫瘍微小環境中のこのようなヒアルロナンは、可溶性の修飾されたヒアルロニダーゼ、例えばPEG化rHuPH20（PEG rHuPH20）を用いてターゲティングできる。また、例示されるように、PEG化rHuPH20の、ドセタキセルまたはリポソームドキシソルピシンなどの化学療法薬との同時投与は、化学療法薬が単独で投与される場合と比較して、動物モデルにおける化学療法薬の抗腫瘍活性を増大させ得る。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、腫瘍を確立するよう、ヒトPC3前立腺癌細胞を用いて筋肉内に接種されたヌードマウスにおける腫瘍量を表す（PC3前立腺癌腫モデル）。接種後、マウスを、活性な薬剤成分（pharmaceutical ingredient）（API）バッファー、30mg/kgドセタキセル、10mg/kgドセタキセル、PEG化rHuPH20（P）またはPEG化rHuPH20および10mg/kgドセタキセル（T+P）のいずれかの用量が投与される治療計画に付した。腫瘍量は、種々の時点で測定し、ドセタキセルの抗腫瘍活性に対する、PEG化rHuPH20とドセタキセルの同時投与の効果を評価した。

【図2】図2は、ヒトPC3前立腺癌細胞の筋肉内注射と、それに続くバッファー（対照マウス）、ドセタキセル、PEG化rHuPH20またはPEG化rHuPH20/ドセタキセルのいずれかでの治療後、種々の点での、1500mm³腫瘍量までのマウス生存のパーセンテージを表す。

【図3】図3は、腫瘍を確立するよう、ヒトPC3前立腺癌細胞を用いて筋肉内に接種されたヌードマウス（PC3前立腺癌腫モデル）中の腫瘍量を表す。接種後、マウスを、APIバッファー、PEG化rHuPH20（P）、リポソームドキシソルピシン（D）またはPEG化rHuPH20およびリポソームドキシソルピシン（D+P）のいずれかの用量が投与される治療計画に付した。腫瘍量を、種々の時点で測定して、リポソームドキシソルピシンの抗腫瘍活性に対する、PEG化rHuPH20とリポソームドキシソルピシンの同時投与の効果を評価した。

【図4】図4は、0、3、7、10、14、17、21、24日目での、3000、7000、10000、または30000ユニットのPEG化rHuPH20（P）の投与後の体重変化（パーセンテージで）を表す。

【図5】図5は、0、7、14および21日目での、ヌードマウスへの10mg/kgドセタキセルと、3000、7000、または10000ユニットいずれかのPEG化rH

u P H 2 0 (T + P) の同時投与後の、体重変化 (パーセンテージで) を表す。これらのマウスはまた、3、10、17および24日目に、3000、7000、または10000ユニットいずれかのPEG化rHuPH20も投与された。A P I バッファーまたは10mg/kgドセタキセル (d o c t a x e l) のみを投与されたマウスの体重変化も表されている。

【図6】図6は、種々の用量のPEG化rHuPH20および10mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 、PEG化rHuPH20単独、タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 単独またはA P I バッファー単独のいずれかを投与されたヌードマウスの血液中の顆粒球の数を表す。0、3、7、10、14、17、21、24日目にA P I バッファーを投与された群1中のマウス；0、3、7、10、14、17、21、24日目に、それぞれ、3000、7000、10000または30000ユニット/マウスのいずれかの用量でPEG化rHuPH20を投与された群2～5；群6～8は、0、7、14、21日目にタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) およびそれぞれ、3000、7000、10000ユニット/マウスのPEG化rHuPH20のいずれかを同時投与され、次いで、3、10、17、24日目にPEG化rHuPH20単独；0、7および14日目に、それぞれ、10mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) または30mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 投与された群9および10。次いで、種々の時点での血液中の顆粒球の数を評価した。

【図7】図7は、PEG化rHuPH20および10mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 、PEG化rHuPH20単独、タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 単独またはA P I バッファー単独のいずれかの種々の用量を投与されたマウスヌードマウスの血清中のアルブミンレベルを表す。0、3、7、10、14、17、21、24日目にA P I バッファーを投与された群1中のマウス；0、3、7、10、14、17、21、24日目に、それぞれ、3000、7000、10000または30000ユニット/マウスのいずれかの用量でPEG化rHuPH20を投与された群2～5；群6～8は、0、7、14、21日目に、タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) およびそれぞれ、3000、7000、10000ユニット/マウスPEG化rHuPH20を同時投与され、次いで、3、10、17、24日目にPEG化rHuPH20単独；0、7および14日目に、それぞれ、10mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) または30mg/kgタキソテール (登録商標) (ドセタキセル) を投与された群9および10。

【図8】図8は、HAが豊富なヒト前立腺腫瘍異種移植モデル、PC3におけるPEG化rHuPH20単独の反復投与の効果を表す。実施例16Aに記載のとおり、0、3、5、7、10、12、14および17日目に、対照バッファーおよび種々の量 (酵素単位 (U)) のPEG化HuPH20を用いてマウスに注射した。V i s u a l S o n i c s (登録商標) 超音波システムを使用し、超音波画像診断ソフトウェアプログラムを使用して像を得ることによって、2、4、7、11、14および18日目に各群の動物において、研究の過程にわたって腫瘍量 (mm^3) を測定した。これらの結果も表29に示されている。

【図9】図9は、A P I バッファーまたは3000UのPEG化rHuPH20の投与後の、さまざまな程度のヒアルロナン (HA) 腫瘍発現 (+ + + 、 + + および +) を有する3種の異なる腫瘍モデル (PC3、4T1-GFP、Mat Ly Lu) における腫瘍量および生存パーセントを表す。結果は実施例17Cに記載され、また、表33～37に示されている。実施例17に記載されるように、各群において各時点で「生存している」動物のパーセンテージを決定することによって各モデルにおける効果を評価した。この研究のために、瀕死 (生存していない) 状態と類似していると考えられる1500 mm^3 以上の腫瘍量をエンドポイントとして選択し、1500 mm^3 未満の腫瘍量を有する動物は生存していると考え、一方で、腫瘍量1500 mm^3 以上を有する動物は病的と考えた。

【図10】図10は、実施例18に記載される、PC3脳腫瘍モデルにおけるPEG化rHuPH20または対照バッファーを用いる治療後の、種々の点での生存しているマウス

10

20

30

40

50

のパーセンテージを表す。生存は、示された時間で生きていたマウス数を評価することによって決定した。

【図 1 1】図 1 1 は、実施例 1 8 に記載される、P C 3 脳腫瘍モデルにおける、対照バッファー、照射、または照射および P E G 化 r H u P H 2 0 の併用療法を用いる治療後の種々の点で生存しているマウスのパーセンテージを表す。生存は、示された時間で生きていたマウス数を評価することによって決定した。

【図 1 2】図 1 2 は、マウスにおける P E G 化 r H u P H 2 0 の投与後の P K 回帰曲線を表す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

概要

A. 定義

B. ヒアルロナン関連状態、疾患および障害を治療するための方法および組成物の概説

1. ヒアルロナン

2. ヒアルロナン関連疾患

3. 治療の方法および組成物

4. その治療の組合せおよび方法

C. ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物

1. ヒアルロニダーゼ

a. 哺乳類種ヒアルロニダーゼ

b. 細菌ヒアルロニダーゼ

c. ヒル、その他の寄生生物および甲殻類に由来するヒアルロニダーゼ

2. その他のヒアルロナン分解酵素

3. 可溶性ヒアルロナン分解酵素

a. 可溶性ヒト P H 2 0

b. r H u P H 2 0

4. ヒアルロナン分解酵素のグリコシル化

5. 修飾された（ポリマーがコンジュゲートしている）ヒアルロナン分解酵素

a. P E G 化可溶性ヒアルロナン分解酵素

D. ヒアルロナン分解酵素をコードする核酸およびそのポリペプチドを製造する方法

1. ベクターおよび細胞

2. 発現

a. 原核細胞

b. 酵母細胞

c. 昆虫細胞

d. 哺乳類細胞

e. 植物

3. 精製技術

4. ヒアルロナン分解酵素ポリペプチドのペグ化

F. 組成物の調製、処方および投与

1. 処方

a. 注射用、溶液およびエマルジョン

b. 凍結乾燥粉末

c. 局所投与

d. その他の経路の投与のための組成物

2. 投与量および投与

3. 併用療法

4. パッケージングおよび製造の品目

G. 活性、バイオアベイラビリティおよび薬物動態を評価する方法

1. ヒアルロナン分解酵素の活性を評価するためのアッセイ

10

20

30

40

50

2. 薬物動態および耐容性

3. 動物モデル

H. ヒアルロナン関連状態、疾患および障害の治療におけるヒアルロナン分解酵素の使用

1. ヒアルロナン関連状態および疾患

ヒアルロナンリッチな癌をはじめとする癌

2. ヒアルロナン関連状態および疾患の治療における使用

a. ヒアルロナン関連疾患マーカーの検出（治療および治療効果を評価するための対象の選択）

i. ヒアルロナン関連疾患マーカーの検出のためのアッセイ

10

i i. 対照サンプルと比較した、ヒアルロナン関連マーカーの検出

b. 癌の治療における使用

抗癌剤およびその他の治療

c. 間質液圧の上昇を伴うその他の疾患の治療における使用

3. 展着剤としての使用

4. 皮下点滴療法における使用

5. 硝子体切除術および眼部障害および状態に対する適用

6. 遺伝子療法適用

7. 化粧的使用

8. 臓器移植における使用

20

9. 脳におけるグリコサミノグリカン蓄積の治療における使用

10. 心血管疾患におけるグリコサミノグリカン蓄積の治療における使用

11. 肺疾患における使用

12. その他の使用

I. 実施例

【0047】

A. 定義

特に断りのない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるような同一の意味を有する。本明細書の全開示内容を通じて言及される、すべての特許、特許出願、公開された出願および刊行物、Genbank配列、データベース、ウェブサイトおよびその他の公開された資料は、特に断りのない限り、その全文において参照により組み込まれる。本明細書において用語に複数の定義が存在する場合には、この節におけるものが優先する。URLまたはその他のこのような識別子またはアドレスが言及される場合には、このような識別子は変わる場合があり、インターネット上の特定の情報は移り変わり得るが、インターネットを検索することによって同等の情報を見い出すことができるということは理解される。それへの言及は、このような情報の有効性および公的普及を証明する。

30

【0048】

本明細書において、投与計画とは、投与される薬剤、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物またはその他の薬剤の量および投与頻度を指す。投与計画は、治療される疾患または状態の関数であり、従って、変わり得る。

40

【0049】

本明細書において、投与頻度とは、治療の連続投与間の時間を指す。例えば、頻度は、数日、数週または数カ月であり得る。例えば、頻度は、週に1回を超える、例えば、週に2回、週に3回、週に4回、週に5回、週に6回または毎日であり得る。また、頻度は、1、2、3または4週間であり得る。個々の頻度は、治療される個々の疾患または状態の関数である。通常、頻度は、週に1回を超え、通常、週に2回である。

【0050】

本明細書において、「投与の周期」とは、連続投与にわたって反復される、酵素および／または第2の薬剤の投与の投与計画の反復されるスケジュールを指す。例えば、例示的

50

な投与の周期は、3週間の週に2回の投与と、それに続く1週間の投薬の中断を含む28日周期である。

【0051】

本明細書において、数週間の投与または投与の中断に関して「所定の」とは、前もって決定または確立された期間を指す。期間は、経験的に決定することができ、疾患または状態、状態の重篤度、個々の患者および治療している医師の技術のレベル内のその他の因子の関数である。

【0052】

本明細書において、ヒアルロナン分解酵素とは、ヒアルロナンポリマー（ヒアルロン酸またはHAとも呼ばれる）の、より低分子量の断片への切断を触媒する酵素を指す。ヒアルロナン分解酵素の例示的なものとして、ヒアルロニダーゼ、および特定のコンドロイチナーゼおよびヒアルロナンを脱重合する能力を有するリアーゼがある。ヒアルロナン分解酵素である例示的コンドロイチナーゼとして、それだけには限らないが、コンドロイチンABCリアーゼ（コンドロイチナーゼABCとしても知られる）、コンドロイチンACリアーゼ（コンドロイチン硫酸リアーゼまたはコンドロイチン硫酸エリミナーゼとしても知られる）およびコンドロイチンCリアーゼが挙げられる。コンドロイチンABCリアーゼは、2種の酵素、コンドロイチン硫酸-ABCエンドリアーゼ（EC 4. 2. 2. 20）およびコンドロイチン硫酸-ABCエキソリアーゼ（EC 4. 2. 2. 21）を含む。例示的なコンドロイチン硫酸-ABCエンドリアーゼおよびコンドロイチン硫酸-ABCエキソリアーゼとして、それだけには限らないが、プロテウス・ブルガリス（*proteus vulgaris*）およびフラボバクテリウム・ヘパリナム（*Flavobacterium heparinum*）に由来するもの（プロテウス・ブルガリスコンドロイチン硫酸-ABCエンドリアーゼは、配列番号98に示されている；Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46）が挙げられる。細菌由来の例示的なコンドロイチナーゼAC酵素として、それだけには限らないが、配列番号99に示される、フラボバクテリウム・ヘパリナムビクチバリス・バデンシス（*Victivallis vadensis*）に由来するもの、およびアンスロバクター・アウレッセンス（*Arthrobacter aureescens*）に由来するもの（Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444）が挙げられる。細菌由来の例示的なコンドロイチナーゼC酵素として、それだけには限らないが、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）およびフラボバクテリウムに由来するもの（Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133）が挙げられる。

【0053】

本明細書において、ヒアルロニダーゼとは、ヒアルロナン分解酵素の1クラスを指す。ヒアルロニダーゼは、細菌ヒアルロニダーゼ（EC 4. 2. 2. 1またはEC 4. 2. 9. 9. 1）、ヒル、その他の寄生生物、および甲殻類に由来するヒアルロニダーゼ（EC 3. 2. 1. 36）、ならびに哺乳類種ヒアルロニダーゼ（EC 3. 2. 1. 35）を含む。ヒアルロニダーゼは、それだけには限らないが、ネズミ、イヌ、ネコ、ウサギ、鳥類、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、魚、カエル、細菌をはじめとする非ヒト起源のいずれか、ならびにヒル、その他の寄生生物、および甲殻類に由来するいずれかを含む。例示的非ヒトヒアルロニダーゼとして、ウシ由来のヒアルロニダーゼ（配列番号10、11、64およびBH55（米国特許第5,747,027号および同5,827,721号）、イエロージャケットワスプ（*yellow jacket wasp*）配列番号12および13）、ミツバチ（配列番号14）、ホワイトフェースホーネット（*white-face hornet*）（配列番号15）、アシナガバチ（*paper wasp*）（配列番号16）、マウス（配列番号17～19、31）、ブタ（配列番号20～21）、ラット（配列番号22～24、30）、ウサギ（配列番号25）、ヒツジ（配列番号26、27、63および65）、チンパンジー（配列番号101）、アカゲザル（配列番号102

)、オランウータン(配列番号28)、カニクイザル(配列番号29)、モルモット(配列番号32)、アルスロバクター(*Arthrobacter*)種(FB24株)(配列番号67)、デロビブリオ バクテリオボラス(*Bdellovibrio bacteriovorus*)(配列番号68)、プロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*)(配列番号69)、ストレプトコッカス・アガラクチア(*Streptococcus agalactiae*)(配列番号70); 18RS21(配列番号71); 血清型Ia(配列番号72); 血清型III(配列番号73)、黄色ブドウ球菌(*staphylococcus aureus*)(COL株(配列番号74); MRSA252株(配列番号75および76); MSSA476株(配列番号77); NCTC 8325株(配列番号78); ウシRF122株(配列番号79
 10
 および80); USA300株(配列番号81)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)(配列番号82); ATCC BAA-255/R6株(配列番号83); 血清型2、D39/NCTC7466株(配列番号84)、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)(血清型M1)(配列番号85); 血清型M2、MGAS10270株(配列番号86); 血清型M4、MGAS10750株(配列番号87); 血清型M6(配列番号88); 血清型M12、MGAS2096株(配列番号89および90); 血清型M12、MGAS9429株(配列番号91); 血清型M28(配列番号92); ブタ連鎖球菌(*Streptococcus suis*)(配列番号: 93~95); ビブリオ・フィシェリ(*Vibrio fischeri*)(ATCC700601/ES114株(配列番号96))、およびヒアルロン酸に
 20
 特異的であり、コンドロイチンまたはコンドロイチン硫酸を切断しないストレプトマイセス・ヒアルロノリチクス(*Streptomyces hyaluronolyticus*) ヒアルロニダーゼ酵素(Ohya, T. and Kaneko, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198:607)が挙げられる。ヒアルロニダーゼはまた、ヒト起源のものも含む。例示的ヒトヒアルロニダーゼとして、HYAL1(配列番号36)、HYAL2(配列番号37)、HYAL3(配列番号38)、HYAL4(配列番号39)およびPH20(配列番号1)が挙げられる。また、ヒアルロニダーゼの中には、ヒツジおよびウシPH20、可溶性ヒトPH20および可溶性rHuPH20をはじめとする可溶性ヒアルロニダーゼも含まれる。市販のウシまたはヒツジ可溶性ヒアルロニダーゼの例として、Vitrase(登録商標)(ヒツジヒアルロニダーゼ)およびAmphadase(登録商標)(ウシヒアル
 30
 ロニダーゼ)がある。

【0054】

ヒアルロナン分解酵素への言及は、前駆体ヒアルロナン分解酵素ポリペプチドおよび成熟ヒアルロナン分解酵素ポリペプチド(例えば、シグナル配列が除去されているもの)、活性を有するその末端切断型を含み、対立遺伝子変異体および種変異体、スプライシング変異体によってコードされる変異体、および配列番号1および10~48、63~65、67~102に示される前駆体ポリペプチドに対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドまたはその成熟型を含むその他の変異体を含む。例えば、ヒアルロナン分解酵素への言及は、配列番号50~51に示されるヒトPH20前駆体ポリペプチド変異体も含む。ヒアルロナン分解酵素はまた、化学修飾または翻訳後修飾を含むものおよび化学修飾または翻訳後修飾を含まないものを含む。このような修飾として、それだけには限らないが、ペグ化、アルブミン化(*albumination*)、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、水酸化、リン酸化、および当技術分野で公知のその他のポリペプチド修飾が挙げられる。

【0055】

本明細書において、可溶性ヒアルロニダーゼとは、生理学的状態下でのその溶解度を特徴とするポリペプチドを指す。可溶性ヒアルロニダーゼは、例えば、37℃に加温されたTriton X-114溶液の水相へのその分配によって識別することができる(Bordier et al., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7)。膜に固定された、例えば、脂質に固

10

20

30

40

50

定されたヒアルロニダーゼは、界面活性剤の豊富な相に分配するが、ホスホリパーゼ C で処理した後は、界面活性剤の乏しい相または水相に分配する。可溶性ヒアルロニダーゼの中には、ヒアルロニダーゼの膜との固定と関連している 1 以上の領域が、除去または修飾されており、可溶性形態がヒアルロニダーゼ活性を保持している、膜に固定されたヒアルロニダーゼが含まれる。可溶性ヒアルロニダーゼは、組換え可溶性ヒアルロニダーゼおよび例えば、ヒツジまたはウシに由来する精巢抽出物などの天然供給源中に含まれるものまたはそれから精製された形態を含む。このような可溶性ヒアルロニダーゼの例示的なものとして、可溶性ヒト PH 20 がある。その他の可溶性ヒアルロニダーゼとして、ヒツジ（配列番号 27、63、65）およびウシ（配列番号 11、64）PH 20 が挙げられる。

10

【0056】

本明細書において、可溶性ヒト PH 20 または sHuPH 20 は、C 末端のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合部位のすべてまたは一部を欠き、その結果、発現時に、ポリペプチドが可溶性である成熟ポリペプチドを含む。例示的 sHuPH 20 ポリペプチドとして、配列番号 4～9 および 47～48 のいずれか 1 種に示されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドが挙げられる。このような例示的 sHuPH 20 ポリペプチドの前駆体ポリペプチドは、シグナル配列を含む。前駆体の例示的なものとして、配列番号 3 および 40～46 に示されるものがあり、その各々は、アミノ酸位置 1～35 に 35 アミノ酸のシグナル配列を含む。可溶性 HuPH 20 ポリペプチドはまた、本明細書に記載される製造および精製方法の間またはその後に分解されたものを含む。

20

【0057】

本明細書において、可溶性組換えヒト PH 20（rHuPH 20）とは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において組換えによって発現されるヒト PH 20 の可溶性形態を指す。可溶性 rHuPH 20 は、シグナル配列を含み、配列番号 49 に示される核酸によってコードされる。また、その対立遺伝子変異体およびその他の可溶性変異体である DNA 分子も含まれる。可溶性 rHuPH 20 をコードする核酸は、CHO 細胞において発現され、CHO 細胞は成熟ポリペプチドを分泌する。培養培地中に産生されるので、C 末端に不均一性があり、その結果、生成物は、種々の量で配列番号 4～9 のうちいずれか 1 種以上を含み得る種の混合物を含む。対応する対立遺伝子変異体およびその他の変異体、例えば、配列番号 50～51 に示される前駆体ヒト PH 20 ポリペプチドに対応するものも含まれる。その他の変異体は、それらが、ヒアルロニダーゼ活性を保持し、可溶性である限り、配列番号 4～9 および 47～48 のいずれかと、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上の配列同一性を有し得る。

30

【0058】

本明細書において、ヒアルロニダーゼ基質とは、ヒアルロニダーゼ酵素によって切断および／または脱重合される基質（例えば、タンパク質または多糖）を指す。通常、ヒアルロニダーゼ基質は、グリコサミノグリカンである。例示的ヒアルロニダーゼ基質として、ヒアルロナン（HA）がある。

【0059】

本明細書において、ヒアルロナン関連疾患、障害または状態とは、ヒアルロナンレベルが、原因、結果として上昇している、そうでなければ、疾患または状態において観察される任意の疾患または状態を指す。ヒアルロナン関連疾患および状態は、組織または細胞におけるヒアルロナン発現の上昇、間質液圧の上昇、血管容積の減少、および／または組織中の水分含量の増大と関連している。ヒアルロナン関連疾患、障害または状態は、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物を、単独または別の治療および／または薬剤と組み合わせて、別の治療および／または薬剤に加えてのいずれかで投与することによって治療できる。例示的疾患および状態として、それだけには限らないが、ヒアルロナンリッチな癌、例えば、腫瘍、例えば、後期癌、転移性癌、未分化癌、卵巣癌、in situ 癌腫（ISC）、扁平上皮癌（SCC

40

50

）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌およびその他の癌などの固形腫瘍が挙げられる。また、ヒアルロナン関連疾患および状態の例示的なものとして、間質液圧の上昇と関連している疾患、例えば、椎間板圧迫と関連している疾患、および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷またはその他の損傷によって引き起こされる浮腫がある。例示的ヒアルロナン関連疾患および状態として、間質液圧の上昇、血管容積の減少、および／または組織における水分含量の増大と関連している疾患および状態、例えば、癌、椎間板圧迫および浮腫が挙げられる。一実施例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療として、間質液圧（I F P）の上昇、血管容積の減少および組織における水分含量の増大のうち1以上に対する、回復、低減またはその他の有益な効果が挙げられる。

【0060】

10

本明細書において、ヒアルロナンレベルの上昇とは、疾患または状態、結果に応じた、そうでなければ疾患において観察される、特定の組織、体液または細胞中のヒアルロナンの量を指す。例えば、ヒアルロナンリッチな腫瘍の存在の結果として、ヒアルロナン（H A）レベルは、血液、尿、唾液および血清などの体液において、および／または腫瘍組織または細胞において上昇し得る。レベルは、標準またはその他の適した対照、例えば、H A関連疾患を有さない対象由来の比較できるサンプルと比較することができる。

【0061】

本明細書において、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素とコンジュゲートしているポリマーとは、ヒアルロナン分解酵素と直接的に、またはリンカーを介して、共有結合によって、または別の方法で安定に連結されている任意のポリマーを指す。このようなポリマーは、通常、血清半減期を増大し、これとして、それだけには限らないがシアル部分、ペグ化部分、デキストラン、ならびに糖およびグリコシル化などのためのその他の部分が挙げられる。

20

【0062】

本明細書において、天然ヒアルロナン分解酵素、例えば、天然可溶性ヒアルロニダーゼは、ポリマー、例えば、ペグ化部分（P E G）またはシアル化部分で修飾されていないヒアルロナン分解酵素である。したがって、天然ヒアルロナン分解酵素は、修飾されていない。通常、天然可溶性ヒアルロニダーゼなどの天然ヒアルロナン分解酵素は、ポリマー、例えば、P E Gのコンジュゲーションによって修飾されているヒアルロナン分解酵素と比較して、生物環境では（例えば、対象では）、減少した半減期を有する。

30

【0063】

本明細書において、比活性とは、m g タンパク質あたりの活性のユニットを指す。ヒアルロニダーゼのミリグラムは、 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のユニットで約1.7のモル吸光係数と仮定する280nmでの溶液の吸収によって定義される。

【0064】

本明細書において、活性とは、全長（完全）タンパク質と関連している、ポリペプチドまたはその一部の機能活性または複数の活性を指す。機能的活性として、それだけには限らないが、生物活性、触媒または酵素活性、抗原性（抗ポリペプチド抗体と結合する能力または抗ポリペプチド抗体との結合についてポリペプチド競合する能力）、免疫原性、多量体を形成する能力、およびポリペプチドの受容体またはリガンドと特異的に結合する能力が挙げられる。

40

【0065】

本明細書において、ヒアルロニダーゼ活性とは、ヒアルロン酸の切断を酵素的に触媒する能力を指す。ヒアルロニダーゼについての米国薬局方（U S P）XX I I アッセイは、高分子量ヒアルロン酸、またはヒアルロナン、酵素をH Aと37℃で30分間反応させた後に残存する（H A）基質の量を測定することによってヒアルロニダーゼ活性を間接的に決定する（USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention、Inc、Rockville、MD）。参照標準溶液をアッセイにおいて使用して、任意のヒアルロニダーゼのユニットでの相対活性を確認することができる。可溶性r H u P H 2 0などのヒアルロニダーゼのヒアルロニダーゼ活性を決定するためのI n v i t r oアッセイは、

50

当技術分野で公知であり、本明細書に記載されている。例示的アッセイとして、切断されていないヒアルロン酸が血清アルブミンと結合する場合に形成される不溶性沈殿を検出することによって、ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸の切断を間接的に測定する、以下に記載されるマイクロ濁度アッセイ（例えば、実施例3を参照）が挙げられる。参照標準を使用して、例えば、標準曲線を作製し、調べられているヒアルロニダーゼのユニットでの活性を決定することができる。

【0066】

本明細書において、ヒアルロニダーゼの活性のユニットとは、標準ヒアルロニダーゼサンプル（例えば、U S PまたはW H O標準）と比較することによって、例えば、濁度低減ユニットが、U. S. P. によって標準化されたヒアルロニダーゼのサンプルの標準曲線（例えば、U S PまたはW H O標準）によってN F U、およびU. S. P. ユニットと関連づけられる、本明細書において実施例2に記載される濁度低減E L I S Aベースのアッセイを使用して決定されるU. S. P. 国民医薬品集（N F X I I I）ユニット（N F U）を指す。したがって、実施例2において決定される酵素活性は、相対T R Uである（例えば、Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172:367を参照）。ヒアルロニダーゼユニットは、標準活性に対して正規化される。したがって、例えば、P E G化ヒアルロニダーゼは、低い活性/m gを示し得る。本明細書における目的上、投与量はユニットを基準とする。特定の修飾されたヒアルロニダーゼのユニット/m g（標準活性）は、必要に応じて、経験的に決定することができる。

【0067】

本明細書において、「機能的に同等な量」またはその文法的変化は、ヒアルロナン分解酵素に関して、ヒアルロニダーゼなどの参照酵素の量と同じ効果を達成するヒアルロナン分解酵素の量を指す。例えば、任意のヒアルロナン分解酵素の活性をr H u P H 2 0の活性と比較して、既知量のr H u P H 2 0と同じ効果を達成するヒアルロナン分解酵素の機能的に同等な量を決定することができる。例えば、ヒアルロナン分解酵素の、展着剤または拡散剤として作用する能力は、トリパンブルーとともにマウスの側面の皮膚に注入することによって評価でき（例えば、米国特許公開番号第2 0 0 5 0 2 6 0 1 8 6号参照）、例えば、1 0 0ユニットのヒアルロニダーゼ参照標準と同じ拡散量を達成するのに必要なヒアルロナン分解酵素の量を決定できる。したがって、必要なヒアルロナン分解酵素の量は、1 0 0ユニットと機能的に同等である。別の実施例では、同時投与される薬剤のi n v i v o活性（例えば、化学療法薬の抗腫瘍活性）を増大するヒアルロナン分解酵素の能力は、実施例14に記載されるような動物モデルまたはヒト対象における評価することができ、例えば、同時投与された薬剤の活性の、投与される量のr H u P H 2 0と同じ増大を達成するのに必要なヒアルロナン分解酵素の量を決定することができる。

【0068】

本明細書において、天然に存在する α -アミノ酸の残基は、荷電t R N A分子の、ヒトにおけるその同族m R N Aコドンを用いる特異的認識によってタンパク質に組み込まれる天然に見られる20個の α -アミノ酸の残基である。

【0069】

本明細書において、核酸は、D N A、R N Aおよびペプチド核酸（P N A）をはじめとするその類似体ならびにそれらの混合物を含む。核酸は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。検出可能な標識、例えば、蛍光または放射標識などで所望により標識されていてもよいプローブまたはプライマーに言及する場合には、一本鎖分子が考慮される。このような分子は、ライブラリーのプロービングまたはプライミングのために、通常、その標的が統計的に独特であるような長さのもの、または低コピー数（通常、5未満、一般に、3未満）のものである。一般に、プローブまたはプライマーは、注目する遺伝子と相補的であるか、またはそれと同一である、少なくとも14、16または30の隣接するヌクレオチドの配列を含む。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100またはそれ以上の核酸長であり得る。

【0070】

本明細書において、ペプチドとは、2～40のアミノ酸の長さであるポリペプチドを指す。

【0071】

本明細書において、本明細書において提供されるアミノ酸の種々の配列中に生じるアミノ酸は、その既知の、3文字または1文字略語に従って同定される（表1）。種々の核酸断片中に生じるヌクレオチドは、当技術分野で日常的に使用される標準の1文字指定を用いて指定される。

【0072】

本明細書において、「アミノ酸」は、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物である。ポリペプチドは、2個以上のアミノ酸を含む。本明細書における目的上、アミノ酸は、20種の天然に存在するアミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ類似体（すなわち、 α -炭素が側鎖を有するアミノ酸）を含む。

【0073】

本明細書において、「アミノ酸残基」とは、ポリペプチドのそのペプチド結合での化学消化（加水分解）の際に形成されるアミノ酸を指す。本明細書において記載されるアミノ酸残基は、「L」異性体の形態であると推定される。そのように指定される「D」異性体の形態の残基は、ポリペプチドによって所望の機能特性が保持される限り、任意のL-アミノ酸残基と置換してもよい。 NH_2 とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。 COOH とは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968)に記載され、37 C. F. R. §§ 1.821-1.822に採用される標準ポリペプチド命名法に沿って、アミノ酸残基の略語は表1に示されている。

表1-対応の表

【0074】

10

20

【表 1】

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/または Gln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/または Asp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知またはその他

10

20

30

【0075】

式によって本明細書に表されるすべてのアミノ酸残基配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の従来の方向に左から右の方向性を有するということは留意されるべきである。さらに、語句「アミノ酸残基」は、対応の表（表1）に列挙されるアミノ酸および修飾された、普通ではないアミノ酸、例えば、37C. F. R. §§ 1. 821-1. 822に言及され、参照によって本明細書に組み込まれるものも含むよう広く定義される。さらに、アミノ酸残基配列の最初または最後のダッシュは、1個以上のアミノ酸残基のさらなる配列との、NH₂などのアミノ末端基との、またはCOOHなどのカルボキシル末端基とのペプチド結合を示すということは留意されるべきである。

40

【0076】

本明細書において、「天然に存在するアミノ酸」とは、ポリペプチド中に生じる20個のL-アミノ酸を指す。

【0077】

本明細書において、「非天然アミノ酸」とは、天然アミノ酸と同様の構造を有するが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するよう構造的に修飾されている有機化合物を指す。したがって、天然に存在しないアミノ酸として、例えば、20種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体が挙げられ、それだけには限らないが、アミノ酸のD-イソステレオマー（isostereomers）が挙げられる。例示的非天然アミノ酸は、本明細書に記載されており、当業者に公知である。

50

【0078】

本明細書において、DNA構築物とは、天然には見られない方法で組み合わせられ、並列されたDNAのセグメントを含む、一本鎖または二本鎖の、直鎖または環状DNA分子である。DNA構築物は、ヒトの操作の結果として存在し、操作された分子のクローンおよびその他のコピーを含む。

【0079】

本明細書において、DNAセグメントとは、特定の性状を有する大きなDNA分子の一部である。例えば、特定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、大きなDNA分子の一部、例えば、プラスミドまたはプラスミド断片であり、これは、5'から3'の方向に読むと、特定のポリペプチドのアミノ酸の配列をコードする。

10

【0080】

本明細書において、用語ポリヌクレオチドとは、5'から3'末端に読まれる、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドは、RNAおよびDNAを含み、天然供給源から単離してもよく、*in vitro*で合成してもよく、天然および合成分子の組合せから調製してもよい。ポリヌクレオチド分子の長さは、本明細書では、ヌクレオチド（「nt」と略される）または塩基対（「bp」と略される）を単位として示される。用語ヌクレオチドは、文脈が許す場合には一本鎖および二本鎖分子のために使用される。この用語が二本鎖分子に適用される場合には、長さ全体を示すよう使用され、用語塩基対と同等であると理解される。二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖は、長さがわずかに異なり得るということおよびその末端がねじれ型であり得；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドが対を形成していない場合があるということは当業者によって認識されよう。このような対を形成していない末端は、通常、20ヌクレオチドの長さを超えない。

20

【0081】

本明細書において、2種のタンパク質または核酸間の「類似性」とは、タンパク質のアミノ酸の配列または核酸のヌクレオチド配列間の関連性を指す。類似性は、残基の配列およびそれに含まれる残基の同一性および／または相同性の程度に基づくものであり得る。タンパク質または核酸間の類似性の程度を評価する方法は、当業者には公知である。例えば、配列類似性を評価する一方法では、2種のアミノ酸またはヌクレオチド配列を、配列間で最大レベルの同一性が生じる方法でアラインする。「同一性」とは、アミノ酸またはヌクレオチド配列が不変である程度を指す。アミノ酸配列およびある程度までのヌクレオチド配列のアラインメントはまた、アミノ酸（またはヌクレオチド）における保存的相違および／または頻繁な置換を考慮し得る。保存的相違とは、関係する残基の物理化学的特性を保存するものである。アラインメントは、包括的（配列の全長にわたり、すべての残基を含む、比較される配列のアラインメント）または局所的（最も類似した領域または複数の領域のみを含む配列の一部のアラインメント）であり得る。

30

【0082】

「同一性」はそれ自体、技術分野で認識された意味を有し、公開された技術を使用して算出できる。（例えば:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991参照）。2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の同一性を測定するためのいくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は、当業者には周知である(Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

40

【0083】

本明細書において、相同（核酸および／またはアミノ酸配列に関して）とは、約25%以上の配列相同性、通常、25%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、

50

90%または95%以上の配列相同性を意味し；正確なパーセンテージは、必要に応じて、指定できる。本明細書における目的上、用語「相同性」および「同一性」は、特に断りのない限り、同義的に使用されることが多い。通常、パーセンテージ相同性または同一性を決定するには、配列を、最高次数のマッチが得られるようにアラインする（例えば：Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991 ; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073参照）。配列相同性によって、保存されたアミノ酸の数が標準アラインメントアルゴリズムプログラムによって決定され、各供給業者によって確立されたデフォルトギャップペナルティーを用いて使用できる。実質的に相同な核酸分子は、通常、注目する核酸の長さのすべてに沿って、中程度のストリンジェンシーで、または高ストリンジェンシーでハイブリダイズする。また、ハイブリダイズする核酸分子中のコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子も考慮される。

【0084】

任意の2種の分子が、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一」または「相同」であるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有するかどうかは、「FASTA」プログラムなどの既知コンピュータアルゴリズムを使用し、例えば、Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444におけるようなデフォルトパラメータを使用して調べることができる（その他のプログラムとして、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994およびCarillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073が挙げられる）。例えば、National Center for Biotechnology Information databaseのBLAST関数を使用して、同一性を求めることができる。その他の市販のまたは公的に入手可能なプログラムとして、DNASTar「MegAlign」プログラム(Madison, WI)およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)「Gap」プログラム(Madison WI)が挙げられる。タンパク質および／または核酸分子の相同性または同一性パーセントは、例えば、GAPコンピュータプログラムを使用して配列情報を比較することによって決定することができる（例えば、Smithによって修正されたNeedleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443およびWaterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482)。手短には、GAPプログラムは、2つの配列の短いほうの中の記号の総数によって除した、類似であるアラインされた記号（すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸）の数として類似性を定義する。GAPプログラムのデフォルトパラメータとして、（1）Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載される、単項比較マトリックス（同一性に対して1および非同源性に対して0の値を含む）およびGribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745の加重比較マトリックス；2）各ギャップに対して3.0のペナルティーおよび各ギャップ中の各記号に対してさらなる0.10ペナルティー；ならびに（3）末端のギャップに対してペナルティーなしを挙げることができる。

【0085】

したがって、本明細書において、用語「同一性」または「相同性」は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較を表す。本明細書において、用語少なくとも「90%同一である」とは、参照核酸またはポリペプチドのアミノ酸配列に対して90～99.99の同一性パーセントを指す。90%以上のレベルの同一性は、例示目的で、

100個のアミノ酸の試験および参照ポリペプチドの長さが比較されると仮定して、試験ポリペプチド中のアミノ酸の10%（すなわち、100のうち10）以下が、参照ポリペプチドのものと異なるという事実を示す。試験および参照ポリヌクレオチド間で同様の比較を行うことができる。このような相違は、ポリペプチドの全長にわたって無作為に分配される点突然変異として表される場合もあり、または、それらは、最大に許容される、例えば、10/100アミノ酸相違までの変動する長さの1または複数の位置に集まっている場合もある（約90%の同一性）。相違は、核酸またはアミノ酸置換、挿入または欠失として定義される。約85～90%を上回る相同性または同一性のレベルで、結果はプログラムおよびギャップパラメータセットと無関係であるはずであり；このような高レベルの同一性は、しばしば、ソフトウェアに頼ることなく手作業によるアラインメントによって容易に評価できる。

10

【0086】

本明細書において、アラインされた配列とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列中の対応する位置をアラインするための相同性（類似性および／または同一性）の使用を指す。通常、50%以上の同一性によって関連している2種以上の配列をアラインする。アラインされた配列のセットとは、対応する位置でアラインされる2種以上の配列を指し、ゲノムDNA配列とアラインされるESTおよびその他のcDNAなどのRNAに由来するアラインする配列を挙げることができる。

【0087】

本明細書において、「プライマー」とは、適した温度で、適当なバッファー中、適当な条件（例えば、4種の異なるヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合剤の存在下）で鋳型によって導かれるDNA合成の開始点として作用し得る核酸分子を指す。当然のことではあるが、特定の核酸分子は、「プローブ」として、また「プライマー」として働き得る。しかし、プライマーは、伸長のための3'ヒドロキシル基を有する。プライマーは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素（RT）-PCR、RNA PCR、LCR、マルチプレックスPCR、パンハンドルPCR、キャプチャーPCR、発現PCR、3'および5' RACE、in situ PCR、ライゲーション媒介性PCRおよびその他の増幅プロトコルをはじめとする種々の方法において使用できる。

20

【0088】

本明細書において、「プライマー対」とは、増幅される（例えば、PCRによって）配列の5'末端とハイブリダイズする5'（上流）プライマーと、増幅される配列の3'末端の相補体とハイブリダイズする3'（下流）プライマーとを含むプライマーのセットを指す。

30

【0089】

本明細書において、「特異的にハイブリダイズする」とは、核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）と標的核酸分子の相補的な塩基対形成によるアニーリングを指す。当業者ならば、特異的ハイブリダイゼーションに影響を及ぼすin vitroおよびin vivoパラメータ、例えば、特定の分子の長さおよび組成に精通している。in vitroハイブリダイゼーションと特に関連するパラメータとして、アニーリングおよび洗浄温度、バッファー組成および塩濃度がさらに挙げられる。高ストリンジェンシーで非特異的に結合している核酸分子を除去するための例示的洗浄条件は、0.1×SSPE、0.1% SDS、65℃であり、中程度のストリンジェンシーで、0.2×SSPE、0.1% SDS、50℃である。同等のストリンジェンシー条件は、当技術分野で公知である。当業者ならば、核酸分子と特定の適用にとって適当な標的核酸分子の特異的ハイブリダイゼーションを達成するよう、これらのパラメータを容易に調整することができる。2種のヌクレオチド配列に関して相補性とは、ヌクレオチドの2種配列が、通常、向かい合うヌクレオチド間で25%、15%または5%未満のミスマッチしか伴わずにハイブリダイズできることを意味する。必要に応じて、相補性のパーセンテージは指定される。通常、2種の分子は、それらが高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするよう選択

40

50

される。

【0090】

本明細書において、生成物と実質的に同一であるとは、十分に類似しており、その結果、注目する特性が十分に不変であり、その結果、生成物の代わりに実質的に同一の生成物を使用できることを意味する。

【0091】

本明細書において、用語「実質的に同一である」または「類似している」は関連技術分野の当業者によって理解される関連で変わるということも理解される。

【0092】

本明細書において、対立遺伝子変異体または対立遺伝子変異は、同一染色体遺伝子座を占める遺伝子の2種以上の代替形態のいずれにも言及する。対立遺伝子変異は、突然変異によって天然に生じ、集団内で表現型多形をもたらし得る。遺伝子突然変異はサイレント（コードされるポリペプチドに変化なし）である場合もあり、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする場合もある。用語「対立遺伝子変異体」はまた、遺伝子の対立遺伝子変異体によってコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。通常、遺伝子の参照型は、野生型および／または集団に由来するポリペプチドの優性型または種の単一の参照メンバーをコードする。通常、種の間および種の中の変異体を含む対立遺伝子変異体は、野生型および／または同一種に由来する優性型と、通常、少なくとも80%、90%以上のアミノ酸同一性を有し；同一性の程度は、遺伝子および比較が種間であるか、種内であるかどうかに応じて変わる。一般に、種内対立遺伝子変異体は、野生型および／または優性型と、少なくとも約80%、85%、90%または95%以上の同一性、例えば、ポリペプチドの野生型および／または優性型と、96%、97%、98%、99%以上の同一性を有する。本明細書において、対立遺伝子変異体への言及は、通常、同一種のメンバー中のタンパク質における変異を指す。

【0093】

本明細書において、「対立遺伝子変異体」と同義的に使用される「対立遺伝子」とは、遺伝子またはその一部の代替形態を指す。対立遺伝子は、同一の遺伝子座または相同染色体上の位置を占める。対象が、遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合には、対象は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であるといわれる。対象が、遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合には、対象は、その遺伝子についてヘテロ接合性であるといわれる。特定の遺伝子の対立遺伝子は、単一のヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドで互いに異なり得、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、突然変異を含有する遺伝子の形態であり得る。

【0094】

本明細書において、種変異体とは、異なる哺乳類種、例えば、マウスおよびヒトをはじめとする異なる種の中のポリペプチドにおける変異体を指す。

【0095】

本明細書において、スプライス変異体とは、2種以上のmRNAをもたらすゲノムDNAの一次転写物の差次的プロセッシングによって生じる変異体を指す。

【0096】

本明細書において、修飾とは、アミノ酸の配列の修飾に関連して使用される場合には、ポリペプチドまたは核酸分子中のヌクレオチドの配列の修飾を説明するよう使用され、それぞれ、アミノ酸およびヌクレオチドの欠失、挿入および置換を含む。ポリペプチドを修飾する方法は、例えば、組換えDNA法を使用することによる、当業者にとって日常的なものである。

【0097】

本明細書において、用語プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合および転写に開始を提供するDNA配列を含有する遺伝子の一部を意味する。プロモーター配列は、いつもではないが通常、遺伝子の5'非コード領域中に見られる。

【0098】

本明細書において、単離または精製されたポリペプチドまたはタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、そのタンパク質が由来する細胞または組織に由来する細胞性物質またはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合には、化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、容易に検出可能な不純物を含まないとと思われる、このような純度を評価するために当業者によって使用される、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）などの分析の標準法によって決定される場合に、または十分に純粋であり、その結果、さらなる精製によって、物質の酵素活性および生物活性などの物理的および化学的特性が検出可能には変更されない場合に、実質的に含まないと決定され得る。化合物を精製して、実質的に化学的に純粋な化合物を製造する方法は、当業者には公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物である場合がある。このような例では、さらなる精製は、化合物の比活性を増大し得る。

10

【0099】

用語細胞性物質を実質的に含まないとは、タンパク質が、それが単離または組換えによって産生された細胞の細胞成分から分離されているタンパク質の調製物を含む。一実施形態では、用語細胞性物質を実質的に含まないとは、約30%（乾重で）未満の非酵素タンパク質（本明細書において、夾雑タンパク質とも呼ばれる）、通常、約20%未満の非酵素タンパク質または10%の非酵素タンパク質または約5%未満の非酵素タンパク質を有する酵素タンパク質の調製物を含む。酵素タンパク質が組換えによって産生される場合には、培養培地も実質的に含まない、すなわち、培養培地は、酵素タンパク質調製物の容量の約20%、10%もしくは5%または20%、10%もしくは5%未満に相当する。

20

【0100】

本明細書において、用語化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まないとは、タンパク質が、タンパク質の合成に関与している化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されている、酵素タンパク質の調製物を含む。この用語は、約30%（乾重で）20%、10%、5%未満またはそれよりも少ない化学的前駆体または非酵素化学物質または成分を有する酵素タンパク質の調製物を含む。

【0101】

本明細書において、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して合成とは、組換え法によって、および／または化学合成法によって製造される核酸分子またポリペプチド分子を指す。

30

【0102】

本明細書において、組換えDNA法を使用することによる組換え手段による製造とは、クローニングされたDNAによってコードされるタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

【0103】

本明細書において、ベクター（またはプラスミド）とは、その発現または複製のいずれかのために、異種核酸を細胞に導入するために使用される個別的な要素を指す。ベクターは、通常、エピソームのままであるが、遺伝子またはその一部のゲノムの染色体中への組み込みを達成するよう設計することができる。酵母人工染色体および哺乳類人工染色体などの人工染色体であるベクターも考慮される。このような媒体の選択および使用は、当業者にはよく知られている。

40

【0104】

本明細書において、発現ベクターとは、調節配列、例えば、このようなDNA断片の発現を達成できるプロモーター領域と機能し得る形で連結しているDNAを発現できるベクターを含む。このようなさらなるセグメントとして、プロモーターおよびターミネーター配列を挙げることができ、場合により、その他の調節配列、例えば、それだけには限らないが、1種以上の複製起点、1種以上の選択マーカー、エンハンサーおよびポリアデニル化シグナルを挙げることができる。発現ベクターは、通常、プラスミドまたはウイルスDNAに由来するか、両方のエレメントを含み得る。したがって、発現ベクターとは、プラ

50

スミド、ファージ、組換えウイルスまたは適当な宿主細胞に導入されると、クローニングされたDNAの発現をもたらすその他のベクターなどの組換えDNAまたはRNA構築物を指す。適当な発現ベクターは、当業者には周知であり、真核細胞および／または原核細胞において複製可能なものおよびエピソームのままであるものまたは宿主細胞ゲノムに組み込むものが挙げられる。

【0105】

本明細書において、ベクターとしてまた、「ウイルスベクター (virus vector)」または「ウイルスベクター (Viral vectors)」が挙げられる。ウイルスベクターとは、外因性遺伝子を細胞に移す (媒体またはシャトルとして) ために外因性遺伝子と作用可能に連結している、操作されたウイルスである。

10

【0106】

本明細書において、DNAセグメントに言及する場合に、機能し得る形で (operably) または機能し得る形で (operatively) 連結しているとは、セグメントが、それらが、その意図される目的と一致して機能する、例えば、転写が、プロモーターで開始し、コードセグメントを通してターミネーターに向かって進行するよう配置していることを意味する。

【0107】

本明細書において、用語評価するとは、サンプル中に存在するプロテアーゼまたはそのドメインの活性の絶対値を得る、または活性のレベルを示す、指数、割合、パーセンテージ、視覚的もしくはその他の価を得るという意味で量的および定性的決定を含むよう意図される。評価は、直接である場合も間接である場合もあり、実際に検出される化学種は、当然、それ自体がタンパク質分解産物である必要はないが、例えば、その誘導体または幾分かさらなる物質であり得る。例えば、SDS-PAGEおよびクマシーブルーでのタンパク質染色などによる補体タンパク質の切断産物の検出。

20

【0108】

本明細書において、生物活性とは、化合物、組成物またはその他の混合物の *in vivo* 投与の際に起こる化合物の *in vivo* 活性または生理反応を指す。したがって、生物活性は、このような化合物、組成物および混合物の治療効果および薬剤活性を包含する。生物活性は、このような活性を試験または使用するよう設計された *in vitro* 系で観察できる。従って、本発明における目的上、プロテアーゼの生物活性は、ポリペプチドが加水分解されるその触媒活性である。

30

【0109】

本明細書において、同等とは、核酸の2種の配列に言及する場合は、問題の2種の配列がアミノ酸の同一配列または同等のタンパク質をコードすることを意味する。同等が、2種のタンパク質またはペプチドへの言及において使用される場合には、2種のタンパク質またはペプチドが、タンパク質またはペプチドの活性または機能を実質的に変更しないアミノ酸置換しか含まない、実質的に同一のアミノ酸配列を有することを意味する。同等が、特性を指す場合には、特性は同程度に存在する必要はない (例えば、2種のペプチドは、異なる割合の同一種類の酵素活性を示し得る) が、活性は、通常、実質的に同じである。

40

【0110】

本明細書において、「調節する」および「調節」または「変更する」とは、タンパク質などの分子の活性の変化を指す。例示的活性として、それだけには限らないが、シグナル変換などの生物活性が挙げられる。調節は、活性の増大 (すなわち、アップレギュレーションまたはアゴニスト活性) 活性の低下 (すなわち、ダウンレギュレーションまたは阻害) または活性の任意のその他の変更 (例えば、周期性、頻度、期間、速度論またはその他のパラメータの変化) を含み得る。調節は、文脈依存性であり得、通常、調節は、指定された状態、例えば、野生型のタンパク質、恒常的状态にあるタンパク質または指定された細胞種もしくは状態で発現されるタンパク質と比較される。

【0111】

50

本明細書において、組成物とは、任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはその任意の組合せであり得る。

【0112】

本明細書において、組合せとは、2種以上の品目間またはそれらの間の任意の関連を指す。組合せは、2種の組成物または2種の収集物などの2種以上の別個の品目であり得、2種以上の品目またはその任意の変異体の単一の混合物などのそれらの混合物であり得る。組合せの要素は、通常、機能的に関連または関係している。

【0113】

本明細書において、キットとは、さらなる試薬などのその他の要素および組合せまたはその要素の使用のための機器を所望により含む、パッケージングされた組合せである。

10

【0114】

本明細書において、「疾患または障害」とは、それだけには限らないが、感染、後天的な状態、遺伝状態をはじめとする原因または状態に起因する生物における病状を指し、同定可能な症状を特徴とする。本明細書において注目する疾患および障害として、ヒアルロン関連疾患および障害がある。

【0115】

本明細書において、疾患または状態を有する対象を「治療すること」とは、対象の症状が部分的にまたは完全に軽減されること、または治療後に静止のままであることを意味する。したがって、治療は、予防、治療および／または治癒を包含する。予防とは、可能性ある疾患の予防および／または症状の悪化または疾患の進行の予防を指す。治療はまた、修飾されたインターフェロンおよび本明細書において提供される組成物の任意の薬剤的使用を包含する。

20

【0116】

本明細書において、製薬上有効な薬剤として、それだけには限らないが、例えば、麻酔薬、血管収縮剤、分散剤、小分子薬および治療用タンパク質をはじめとする従来の治療薬を含めた任意の治療薬または生物活性剤が挙げられる。

【0117】

本明細書において、治療とは、状態、障害または疾患またはその他の適応症の症状が、回復される、そうでなければ、有益に変更される任意の方法を意味する。

【0118】

本明細書において、治療効果とは、疾患もしくは状態の症状を変更する、通常、改善もしくは回復させる、または疾患もしくは状態を治癒させる、対象の治療に起因する効果を意味する。治療上有効な量とは、対象への投与後に治療効果をもたらす、組成物、分子または化合物の量を指す。

30

【0119】

本明細書において、用語「対象」とは、ヒトなどの哺乳類をはじめとする動物を指す。

【0120】

本明細書において、患者とは、ヒト対象を指す。

【0121】

本明細書において、医薬組成物またはその他の治療薬の投与などによる治療による、特定の疾患または障害の症状の回復とは、組成物または治療薬の投与に起因し得るまたはそれと関連する症状の、永久であるか、一時的であるか、持続性であるか一過性であるかに関わらない任意の緩和を指す。

40

【0122】

本明細書において、防止または予防とは、疾患または状態を発症する危険が低減される方法を指す。

【0123】

本明細書において、「治療上有効な量」または「治療上有効な用量」とは、薬剤、化合物、物質、または治療効果を引き起こすのに少なくとも十分である化合物を含有する組成物の量を指す。したがって、それは、疾患または障害の症状を予防、治癒、回復、停止ま

50

たは部分的に停止するのに必要な量である。

【0124】

本明細書において、単位用量形態とは、ヒトおよび動物対象に適しており、当技術分野で公知のように個別のパッケージングされている物理的に別個の単位を指す。

【0125】

本明細書において、単一剤形処方とは、直接投与用の処方を指す。

【0126】

本明細書において、「製品」とは、製造され、販売される生成物である。本願を通じて使用されるように、この用語は、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、およびパッケージングの品目中に含まれる第2の医薬組成物を包含するものとする。

10

【0127】

本明細書において、流体とは、流れることができる任意の組成物を指す。したがって、流体とは、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリームの形態である組成物およびその他のこのような組成物を包含する。

【0128】

本明細書において、「キット」とは、本明細書において提供される組成物と、それだけには限らないが、活性化、投与、診断および生物活性または特性の評価をはじめとする目的のための別の品目の組合せを指す。キットは、所望により、使用するための機器を含んでもよい。

【0129】

本明細書において、細胞抽出物または溶解物とは、溶解された、または破壊された細胞からできている調製物または画分を指す。

20

【0130】

本明細書において、動物は、それだけには限らないが、ヒト、ゴリラおよびサルを含めた霊長類；マウスおよびラットなどのげっ歯類；ニワトリなどの家禽；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどの反芻動物；ブタおよびその他の動物などのヒツジなどの任意の動物を含む。非ヒト動物は、考慮される動物としてヒトを除外する。本明細書において提供される酵素は、任意の供給源、動物、植物、原核生物および真菌に由来する。ほとんどの酵素は、哺乳類起源を含めた動物起源のものである。

【0131】

本明細書において、対照とは、試験パラメータで処理されていない点を除き、試験サンプルと実質的に同一であるサンプルを指し、それが、血漿サンプルである場合には、注目する状態の影響を受けていない正常なボランティアに由来するものであり得る。対照はまた、内部対照でもあり得る。

30

【0132】

本明細書において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上明確に他に指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞外ドメイン」を含んでなる化合物への言及は、1つまたは複数の細胞外ドメインを含む化合物を含む。

【0133】

本明細書において、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表すことができる。約はまた、正確な量も含む。したがって、「約5個の塩基」とは、「約5個の塩基」および「5個の塩基」も意味する。

40

【0134】

本明細書において、「任意選択の」または「所望により」とは、続いて記載される事象または状況が生じるか生じないこと、およびこの記載が前記事象または状況が生じる場合およびそうではない場合を含むことを意味する。例えば、所望により置換されていてよい基とは、基が非置換であるか、置換されていることを意味する。

【0135】

本明細書において、抗癌治療は、癌を治療するための、薬物およびその他の薬剤の投与

50

、ならびにまた照射などの治療プロトコールも含む。

【0136】

本明細書において、治療用抗体とは、治療に使用するための任意の抗体を指し、これとして、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、s c F v、ダイアボディー、F a bおよびその他の抗体の断片が挙げられる。

【0137】

本明細書において、抗体断片とは、全長抗体の特異的結合能力の少なくとも一部を保持する、全長未満である抗体の任意の誘導体を指す。抗体断片の例として、それだけには限らないが、F a b、F a b'、F (a b) 2、一本鎖F v s (s c F v)、F v、d s F v、ダイアボディーおよびF d断片が挙げられる。断片は、ジスルフィド橋などによって一緒になって連結している複数の鎖を含み得る。抗体断片は、一般に、少なくとも約50個のアミノ酸、通常、少なくとも200個のアミノ酸を含む。

10

【0138】

本明細書において、F v抗体断片は、非共有相互作用によって連結している、1つの重鎖可変ドメイン (V H) および1つの軽鎖可変 (V L) ドメインからなる。

【0139】

本明細書において、d s F vとは、V H-V L対を安定させる、操作された分子間ジスルフィド結合を含むF vを指す。

【0140】

本明細書において、F (a b) 2断片とは、p H 4. 0~4. 5でのペプシンを用いる免疫グロブリンの消化に起因する抗体断片である；組換えによって製造できる。

20

【0141】

本明細書において、F a b断片とは、パパインを用いる免疫グロブリンの消化に起因する抗体断片であり；組換えによって製造できる。

【0142】

本明細書において、s c F v sとは、任意の順序でポリペプチドリinkerによって共有結合によって接続している軽鎖可変鎖 (V L) および重鎖可変鎖 (V H) を含む抗体断片を指す。リンカーは、2つの可変ドメインが、実質的に干渉することなく架橋されるような長さのものである。例示的リンカーとして、溶解度を高めるよういくつかのG l uまたはL y s残基がいたるところに分散している、(G l y-S e r) n残基がある。

30

【0143】

本明細書において、h s F vとは、普通は、F a b断片中に存在する定常ドメインが、ヘテロ二量体コイルドコイルドメインで置換されている抗体断片を指す（例えば、Arndt et al. (2001) J Mol Biol. 7:312:221-228参照）。

【0144】

本明細書において、ダイアボディーは、二量体のs c F vであり；ダイアボディーは、通常、s c F vよりも短いペプチドリinkerを有し、選択的に二量化する。

【0145】

本明細書において、ヒト化抗体とは、ヒトへの投与が免疫応答を誘発しないようアミノ酸の「ヒト」配列を含むよう改変された抗体を指す。このような抗体を調製する方法は公知である。例えば、モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、非可変領域のアミノ酸組成がヒト抗体に基づいている抗体を発現するよう、組換えDNA技術によって変更される。コンピュータプログラムは、このような領域を同定するよう設計されている。

40

【0146】

本明細書において、任意の保護基、アミノ酸およびその他の化合物の略語は、特に断りのない限り、その一般的な用法、認識された略語、またはI U P A C-I U Bの生化学命名法に関する委員会 (I U P A C-I U B C o m m i s s i o n o n B i o c h e m i c a l N o m e n c l a t u r e) ((1972) Biochem. 11:1726参照) に一致する。

【0147】

50

B. ヒアルロナン関連状態、疾患および障害を治療するための方法および組成物の概説

ヒアルロナン関連状態、疾患および障害を治療するための方法、組成物および組合せが、本明細書において提供される。本明細書において提供される方法、組成物および組合せは、ヒアルロン酸（ヒアルロナンとも呼ばれる）を分解できるヒアルロナン分解酵素を使用し、ヒアルロン酸は、細胞外マトリックスの必須成分であり、間質バリアの主要な成分である。多数の疾患および状態が、ヒアルロナンなどのヒアルロニダーゼ基質の蓄積された発現または過剰発現と関係しており、これが、疾患または状態の進行および／または重篤度の原因となる。したがって、基質を脱重合することを目的としたこのような酵素の投与は、このような疾患および状態の治療をもたらし得る。

【0148】

任意のヒアルロナン分解酵素、例えば、その任意の変異体（例えば、末端切断型変異体）を、その酵素が酵素活性を示すならば、本明細書において使用できる。一般に、ヒアルロナン分解酵素は、酵素の半減期を増大するようポリマー（例えば、PEG）とのコンジュゲーションによって修飾される。半減期の増大は、全身性ヒアルロニダーゼ活性およびヒアルロナン分解のための作用の持続期間を増大し得る。さらに、半減期の増大はまた、疾患または状態と関連しているヒアルロニダーゼ基質の再合成および再生の防止にも寄与し得る。例えば、本明細書に記載されるように、ポリマーとのコンジュゲーションによる半減期の増大を示す修飾されたヒアルロナン分解酵素は、腫瘍内のヒアルロナン再生を防ぎ得る。本明細書において提供される修飾されたヒアルロナン（hyaluronan）分解酵素はまた、ヒアルロナン関連状態、疾患および／または障害を治療するための第2の薬剤と組み合わせてもよく、かつ／または同時に処方されてもよい。

【0149】

1. ヒアルロナン

グリコサミノグリカン（GAG）は、細胞外マトリックス（ECM）の複雑な直鎖ポリサッカライドである。GAGは、N-置換されたヘキソサミンおよびウロン酸（例えば、ヒアルロナン（HA）、コンドロイチン硫酸（CS）、コンドロイチン（C）、デルマタン硫酸（DS）、ヘパラン硫酸（HS）、ヘパリン（H））またはガラクトース（例えば、ケラタン硫酸（KS））の反復する二糖構造を特徴とする。HAを除いて、すべては、コアタンパク質と共有結合によって結合して存在する。そのコアタンパク質を含むGAGは、構造的にプロテオグリカン（PG）と呼ばれる。

【0150】

HAは、直鎖の、N-アセチルグルコサミンおよびグルクロン酸二糖単位で構成されている反復性多糖である。HAの代謝（methabolism）は、動的過程であり、皮膚では数週間～1日未満の範囲の組織における正常なターンオーバーを伴う。HAは、3種の保存されたHAシンターゼ（HAS）によって細胞膜で合成され、受容体媒介性エンドサイトーシス後に、細胞結合型または酸性活性ヒアルロニダーゼ(Culty 1992; Zhou 2000)およびエキソグリコシダーゼ酵素によって単糖に分解される。

【0151】

HAは、多数の細胞の細胞外マトリックス中に、特に、軟結合組織中に生じる。ヒアルロナン（HA）は、大部分は、結合組織、皮膚、軟骨中に、哺乳類では滑液中に生じる。ヒアルロナンはまた、眼の硝子体の主な成分である。HAには、水中で、および細胞内マトリックスにおける血漿タンパク質ホメオスタシスなど種々の生理学的機能が割り当てられてきた(Laurent TC et al. (1992) FASEB J 6: 2397-2404)。結合組織では、ヒアルロナンと会合している水和の水は、組織間の空間を増大させ、したがって、細胞移動および増殖の助けとなる環境を作り出す。身体では、例えば、対象の組織では、ヒアルロナン（ヒアルロン酸）は、約5時間の半減期で置き換えられ、組織を通る流体流動に対する抵抗に大きく関与している。ヒアルロナンは、細胞運動性と関連している生物学的現象、例えば、迅速な発達、再生、修復、胚発生、発生学的発達、創傷治癒、脈管形成、および腫瘍形成において役割を果たす（例えば、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. 7:1233-1241参照)。H A 産生は、増殖中の細胞において増大し、有糸分裂において役割を果たす可能性がある。また、歩行運動および細胞遊走ならびに細胞調節、発達および分化における役割と関係している(Laurent et al.. (1992) FASEB J 6: 2397-2404)。

【0152】

H A は、臨床医学において使用されている。その組織保護的および流体力学的特性は、白内障手術の際に角膜内皮を保護するために眼部手術において有用であると証明されている。血清H A は、肝臓疾患および関節リウマチなどの種々の炎症状態の診断に用いる。H A の蓄積によって引き起こされる間質性浮腫は、種々の臓器において機能障害を引き起こし得る(Laurent et al. (1992) FASEB J 6: 2397-2404)。ヒアルロナンタンパク質相互作用はまた、細胞外マトリックスまたは「基質」の構造に関与している。

10

【0153】

H A 合成は、発癌性ウイルスが、線維芽細胞を癌化する場合に増大し、H A の上昇したレベルは、メラノーマおよびいくつかの癌腫などの種々の癌において、過剰増殖および悪性形質と関連している(例えば、Itano et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99;3609-3614.参照)。さらに、ヒアルロナンレベルは、腫瘍攻撃性と相関する(Ozello et al.. 1960 Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi et al.. 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata et al.. 1983 Cancer Res. 43:1347-1354)。多数の固形腫瘍悪性病変においてH A 代謝の局所的異常が報告されており、これでは、H A のレベルの上昇が、乳癌、胃癌、結腸直腸癌、卵巣癌、前立腺癌および肺癌などの腫瘍における予後不良と相関することが多い。H A 蓄積は、腫瘍細胞間および腫瘍細胞中の接触障害を低減する(例えば、Itano et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99;3609-3614.参照)。

20

【0154】

2. ヒアルロナン関連疾患

多数の疾患または状態は、ヒアルロニダーゼ基質、例えば、H A の過剰発現または蓄積された発現と関連しており、これが、疾患または状態の重篤度または予後を増悪させるか、またはその原因となり得る。H A 蓄積の根底にある原因は、H A シンターゼ過剰発現、リンパ排水の不良または基質の不均衡な合成および分解のうち1つ以上による可能性が高い。

【0155】

したがって、提供された組成物、化合物および方法で治療できるヒアルロナン関連疾患、状態および障害の中には、疾患、状態または障害の原因、結果または症状として、ヒアルロンを発現または蓄積する状態、疾患および障害がある。このような疾患、状態および／または障害として、例えば、間質液圧の上昇、血管容積の減少、組織における水分含量の増大と関連しているもの、椎間板圧迫および浮腫が挙げられる。ヒアルロナン関連疾患、状態および／または障害として、それだけには限らないが、ヒアルロナンリッチな癌、例えば、腫瘍、例えば、固形腫瘍、例えば、後期癌、転移性癌、未分化癌、卵巣癌、in situ 癌腫 (ISC)、扁平上皮癌 (SCC)、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌およびその他の癌が挙げられる。また、ヒアルロナン関連疾患および障害の例示的なものとして、椎間板圧迫、癌および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷またはその他の傷害によって引き起こされる浮腫がある。

30

40

【0156】

例えば、ヒアルロナン関連疾患または状態として、良性および悪性腫瘍を含めた固形腫瘍が挙げられる。固形腫瘍悪性病変の例示的なものとして、例えば、乳癌、胃癌、結腸直腸癌、卵巣癌、前立腺癌および肺癌と関連しているものが挙げられる。腫瘍、特に、悪性腫瘍におけるH A レベルの異常な蓄積は、間質または細胞内コンパートメントと関連している場合に予後不良の指標である。

【0157】

例えば、Auvinen(2000)による乳癌を有する患者の生存の研究では、5年生存は、間質H A レベルの増大の関数として低下し；低、中および高H A レベルそれぞれについて、5

50

年の全生存は、45%、39%および26% ($p = 0.002$)であり、再発を含まない生存は、66%、56%および40%であった ($p = 0.008$)。HA陽性癌腫細胞の存在は、腋窩リンパ節陽性および分化不良と有意に関連していた。HA陽性癌腫細胞を示す患者の5年の全生存は、HA陽性癌腫細胞を有さない患者と比較して大幅に低かった (それぞれ、54%対81%、 $p = 0.01$)。

【0158】

胃癌では、Setälä et al. (1999)によって、215人のステージI～IVの胃癌患者のHAプロフィールが調べられた。高割合のHA陽性細胞が見られ、深い腫瘍浸潤、結節性転移、陽性リンパ浸潤、分化段階の不良と、ならびに一変量生存率解析において予後が劣ることと有意に関連していた。評価された腫瘍の44パーセントが、30～100%のHA陽性細胞というHA標識指数を有していた。

10

【0159】

結腸直腸癌では、Ropponen et al. (1998)は、202人の、平均14年フォローアップした結腸直腸癌サンプルにおいて、全生存および無再発生存との、細胞におけるHAの関連を調べた。高いHA強度および標識指数の両方が見られることが多く、より低い全生存、より短い無再発生存期間および187人の評価可能患者のデュークス分類の上昇と有意に関連していた。

【0160】

Anttila et al. (2000)は、309人の卵巣上皮癌および45の対応した転移病巣においてHAレベルを研究した。症例の73% (309人のうち227人)では、ヒアルロナン陽性癌細胞の割合が<10%であったのに対し、高い間質HAレベルは、分化不良、重篤な組織型、進行したステージ、および大きな原発残存腫瘍と有意に関連していた。

20

【0161】

ヒアルロナン関連疾患は、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物を、単独または別の治療および／または薬剤と組み合わせた、または別の治療および／または薬剤に加えてのいずれかで投与することによって治療できる。ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療は、間質液圧 (IFP) の上昇、血管容積の減少、および／または組織における水分含量の増大などの任意の関連物理的発現または症状のうち1つまたは複数に対する、回復、低減またはその他の有益な効果を含む。

30

【0162】

一例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療は、間質液圧 (IFP) の上昇、血管容積の減少、および組織における水分含量の増大のうち1つまたは複数に対する回復、低減またはその他の有益な効果を含む。別の例では、治療は、別の症状、例えば、腫瘍の大きさ (例えば、質量／容量)、対象の生存および／または無再発生存を含めた予後に対する回復または有益な効果を含み得る。

【0163】

3. 治療の方法および組成物

したがって、ヒアルロナン (HA) 関連状態、疾患および障害を治療するための方法および組成物が本明細書において提供される。治療方法などの方法は、修飾されたヒアルロナン分解酵素を単独で含有する組成物または修飾されたヒアルロナン分解酵素を含有し、さらにヒアルロナン関連状態、疾患および／または障害を治療するための1種または複数のさらなる薬剤を含有する組成物もしくは組合せを使用する。本明細書における方法において使用される組成物および組合せでは、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、1種または複数のポリマーとのコンジュゲーションなどによって修飾され、それによって、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロニダーゼの半減期が増大する。本明細書において提供される修飾されたヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナン関連状態、疾患および障害を治療するために単独で使用してもよく、または例えば、治療薬 (例えば、化学療法薬) などのその他の薬剤と組み合わせて使用してもよい。ヒアルロナン分解酵素およびその他の薬剤 (単数または複数) を含有する組成物は組み合わせて別個に提供されていも

40

50

よく、または単一組成物中で提供されてもよい。

【0164】

いくつかの例では、修飾されたヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナン関連疾患または状態の治療のために単独で投与される。したがって、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する組成物、および、ヒアルロナン関連疾患、すなわち、ヒアルロニダーゼ基質の蓄積された発現と関連している疾患を治療するために修飾されたヒアルロナン分解酵素を投与する方法も、本明細書において提供される。例えば、このような治療は、ヒアルロナン関連疾患、例えば、ヒアルロナンリッチな癌において間質液圧の低下を達成するために使用できる。本明細書において示されるように、修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素を用いる治療は、ヒアルロナンを除去し、間質液圧（IFP）を低下させるだけでなく、接触障害も回復させ得る。したがって、ヒアルロナン分解酵素の投与は、細胞間および細胞の間の接触の回復によって治療を達成し得る。本明細書において示されるように、ペグ化などによるヒアルロナン分解酵素の修飾は、腫瘍の治療としてのヒアルロナン分解酵素の有効性を改善する。

10

【0165】

特に、修飾されたヒアルロナン分解酵素の全身投与は、脳腫瘍を含めた腫瘍を治療するのに有効である。例えば、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の全身投与は、ヒアルロナンリッチな腫瘍において間質液圧（IFP）を低下させ、IFPの用量依存性の、持続した低減、例えば、1時間、2時間、4時間、8時間、10時間、12時間、16時間、24時間、48時間または72時間を超えて持続する低減を達成する。ヒアルロニダーゼは、このような低減をヒアルロナン特異的に達成できる。

20

【0166】

さらに、ヒアルロナン関連腫瘍を有する対象において、投与後にヒアルロナン発現を低減する能力と一致して、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の全身投与は、腫瘍水分含量の、例えば、少なくとも1時間、2時間、4時間、8時間、10時間、12時間、16時間、24時間、48時間または72時間の持続した低減および腫瘍中の血管の血管除圧に起因する、ヒアルロナン関連腫瘍中の血管容積の減少を達成し得る。したがって、さらに、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素を含有する組成物、ならびにヒアルロナン関連疾患または状態、例えば、ヒアルロナン関連癌を有する対象における、血管容積の持続した増大および／または組織中の水分含量の持続した増大を達成するための投与方法が、本明細書において提供される。

30

【0167】

修飾されていないヒアルロナン分解酵素は、通常、数分、一般に、5分未満の、血液中での酵素活性の短い半減期を有する。これは、このような酵素が、一般に、静脈内投与およびその作用期間が短命であるその他の投与において使用するのに適していないことを意味する。本明細書における組成物および方法において使用される可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン（hyaluronan）分解酵素は、ポリマー、例えば、シアル化部分またはペグ化部分（PEG）とのコンジュゲーションによって修飾される。概して、またはポリマーは、対象に投与した後の、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の半減期を増大する。本明細書において提供される修飾されたヒアルロナン分解酵素（例えば、ポリマーとのコンジュゲーションによって）の酵素活性の血漿半減期は、概して、または約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、45時間、50時間、55時間、60時間またはそれ以上である。一例では、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾された可溶性ヒアルロニダーゼは、修飾されていない酵素と比較して、血漿半減期の100倍、200倍、250倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍超またはそれ以上の増大を達成する。一例では、血漿における

40

50

酵素の半減期は、24時間を超える。

【0168】

半減期の相違によって、修飾されたヒアルロニダーゼの活性の期間は、天然の（ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されていない）ヒアルロニダーゼと比較して増大する。例えば、天然の（修飾されていない）可溶性ヒアルロニダーゼの投与後、例えば、ヒアルロン酸は24時間内に回復し得、観察可能な変化は残らない。ヒアルロナン分解酵素の半減期を増大させるポリマー（例えば、PEG）とのコンジュゲーションによって修飾されているヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与後、ヒアルロナンの発現は、投与後24時間、48時間、72時間またはそれ以上で低減したままである。

【0169】

一般に、ポリマーとコンジュゲートしている修飾されたヒアルロナン分解酵素は、修飾されていないヒアルロナン分解酵素と比較して、低下した比活性を有していた。比活性は、通常、約2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上低下する。例えば、本明細書において別に記載されるように、修飾されていないPH20である指定されたrHuPH20の比活性は、約120,000U/mgである。PEG化rHuPH20の比活性は、約30,000U/mgである。それにもかかわらず、半減期の増大によって、修飾されたヒアルロナン分解酵素は、活性期間の増大を示す。HAは再生され得るので、持続した作用期間を有する酵素は、HA再合成およびECMにおける沈着に対抗し得る。

【0170】

したがって、本明細書において提供される方法、組合せおよび組成物では、修飾されたヒアルロナン分解酵素、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼは、血漿中、少なくとも3U/mLの酵素のHAの最小の血漿レベルを持続するのに十分な量で提供される。例えば、HAの最小血漿レベルは、3U/mL~12U/mLもしくはそれ以上である、または約3U/mL~12U/mLもしくはそれ以上であるレベル、例えば、約4U/mL、5U/mL、6U/mL、7U/mL、8U/mL、9U/mL、10U/mL、11U/mL、12U/mL、13U/mL、14U/mL、15U/mL、16U/mL、17U/mL、18U/mL、19U/mL、20U/mL、25U/mL、30U/mL、35U/mL、40U/mL、45U/mL、50U/mLもしくはそれ以上のレベルまたは4U/mL、5U/mL、6U/mL、7U/mL、8U/mL、9U/mL、10U/mL、11U/mL、12U/mL、13U/mL、14U/mL、15U/mL、16U/mL、17U/mL、18U/mL、19U/mL、20U/mL、25U/mL、30U/mL、35U/mL、40U/mL、45U/mL、50U/mLもしくはそれ以上のレベルで維持される。血漿中、少なくとも3U/mLの酵素を維持することによって、酵素は、疾患または状態と関連しているHA、例えば、腫瘍のHAを除去し、HA再合成に対抗できる。したがって、このような治療では、ヒアルロニダーゼ基質は、蓄積することが許されない。予後がHA発現と関連している、悪性固形腫瘍を有する癌などの疾患または状態について、状態（例えば癌性状態）は治療および/または回復させることができる。

【0171】

したがって、提供された、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する組成物は、蓄積されたヒアルロニダーゼ基質と関連している疾患または状態の延長または持続された治療、例えば、1種または複数の症状の延長または持続された回復を提供し得る。例えば、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されている修飾された可溶性ヒアルロニダーゼの全身（例えば、静脈内の）投与は、ヒアルロナンリッチな腫瘍の組織中の細胞周囲（pericellular）マトリックスにおける、ヒアルロナン発現の持続された（例えば、少なくとも24、48および72時間）低減を達成し得る。

【0172】

血漿中での修飾された酵素の効果を、長期間持続するよう、投与の周期を達成できる。したがって、血漿中の修飾されたヒアルロニダーゼの一定レベルを任意の所望の時間維持

10

20

30

40

50

するために、修飾された酵素を、投与計画にわたって連続的に投与できる。血漿中のレベルは、血漿中の修飾されたヒアルロニダーゼのレベルを測定することによって、本明細書に記載される治療の過程の間モニタリングできる。これは、治療の過程にわたって、疾患または状態と関連しているHAを除去するだけでなく、HA再合成に対抗するのに十分な最小レベルのヒアルロニダーゼが血漿中に存在するということを意味する。連続投与は、血漿中のレベルが少なくとも3 U/mLまたは約3 U/mLを下回って低下するときはいつでも周期的に行うことができる。しかし、各投与の前に血漿レベルを測定する必要はない。通常、少なくとも3 U/mLのヒアルロニダーゼの血漿中レベルを維持するには、ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する組成物を、1カ月に数回、通常、1週間に少なくとも1回、通常、1週間に2回以上投与する。例えば、修飾されたヒアルロナン分解酵素、例えば、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼを、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回または毎日投与する。通常、このような酵素を、1週間に2回投与する。

【0173】

本明細書において別に論じられるように、少なくとも3 U/mLのヒアルロニダーゼの血漿レベルを維持するのに必要な修飾されたヒアルロニダーゼ酵素の用量は、経験的に決定することができる。本明細書に例示されるように、通常、血漿中、少なくとも3 U/mLを維持するための修飾された可溶性ヒアルロニダーゼの単回投与の用量は、投与の周期にわたって、0.02 mg/kg（対象の）、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.30 mg/kg、0.35 mg/kg、0.40 mg/kg、0.45 mg/kg、0.5 mg/kg、0.55 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1.0 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kgもしくはそれ以上である、または約0.02 mg/kg（対象の）、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg、0.25 mg/kg、0.30 mg/kg、0.35 mg/kg、0.40 mg/kg、0.45 mg/kg、0.5 mg/kg、0.55 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1.0 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kgもしくはそれ以上である。通常、用量は、0.05 mg/kgまたは約0.05 mg/kg～0.8 mg/kgまたは約0.8 mg/kgである。以下に論じられるように、このような量は、所望の時間血漿レベルを維持するよう、投与の周期にわたって周期的に（例えば、週に2回）投与されるということは理解される。平均ヒトが75 kgであるとすれば、20,000 U/mg～60,000 U/mgのまたは約20,000 U/mg～60,000 U/mgの、通常、35,000 U/mgまたは約35,000 U/mgの比活性を有する修飾された可溶性ヒアルロニダーゼを、60,000 U；70,000 U；80,000 U；90,000 U；100,000 U；200,000 U；300,000 U；400,000 U；500,000 U；600,000 U；700,000 U；800,000 U；900,000 U；1,000,000 U；1,500,000 U；2,000,000 U；2,500,000 U；3,000,000 U；3,500,000 U；4,000,000 Uもしくはそれ以上または約60,000 U；70,000 U；80,000 U；90,000 U；100,000 U；200,000 U；300,000 U；400,000 U；500,000 U；600,000 U；700,000 U；800,000 U；900,000 U；1,000,000 U；1,500,000 U；2,000,000 U；2,500,000 U；3,000,000 U；3,500,000 U；4,000,000 Uもしくはそれ以上で投与する。例えば、2.0～60 mgまたは約2.0～60 mgの修飾されたヒアルロニダーゼを含有する修飾された

10

20

30

40

50

ヒアルロニダーゼの組成物を投与できる。また、このような組成物が本明細書において提供される。

【0174】

投与の周期の時間の長さは、経験的に決定でき、治療される疾患、疾患の重篤度、個々の患者および治療医師の技術のレベル内のその他の考慮すべき事柄に応じて変わる。修飾されたヒアルロニダーゼ酵素を用いる治療の時間の長さは、1週間、2週間、1カ月、数カ月、1年、数年またはそれ以上であり得る。例えば、修飾されたヒアルロニダーゼ酵素を、1年またはそれ以上の期間にわたって週に2回投与できる。治療の中断がなく疾患症状が持続する場合には、治療を、さらなる時間の長さ継続してもよい。治療の過程にわたって、疾患および／または治療に関連する毒性または副作用の証拠をモニタリングできる。

10

【0175】

さらに、投与の周期は、酵素の曝露からの休止期間を提供するよう治療の中断の期間を加えるよう目的に合わせることができる。治療の中断の時間の長さは、所定の時間であり得、または患者がどのように応答しているかに応じて、もしくは観察される副作用に応じて経験的に決定できる。例えば、治療は、1週間、2週間、1カ月または数カ月中断してもよい。治療の中断期間の間、ヒアルロニダーゼの血漿レベルは、3 U/mLより低く低下するということは理解され、予想される。通常、治療の中断の期間は、患者の投与周期計画に組み込まれる。例えば、例示的投与計画は、28日の治療周期であり、修飾された酵素が最初の3週間、週に2回投与され、投薬を伴わない1週間を続ける。一例では、0.05 mg/kg ~ 0.8 mg/kgの修飾された酵素は、週に2回3週間投与し、投薬を伴わない1週間を続けることができる。したがって、28日周期の過程にわたって、例えば、1、4、8、11、15および18日目に修飾された酵素を用いて患者に投薬し、1週間の治療の中断を続けることができる。上記のように、投与の周期は、任意の所望の時間の長さであり得る。したがって、28日周期の投与を、任意の時間の長さ反復してもよい。患者にとって固有の個人的な考慮すべき事柄および治療される疾患に応じて患者の要求を満たす投与の周期および投与計画を選ぶことは、治療医師の技術レベルの範囲内である。

20

【0176】

4. 組合せおよびその治療方法

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロン酸を一時的に消化し、それによって、薬剤のデリバリーを促進する。したがって、例えば、ヒアルロナン分解酵素の、グリコサミノグリカンの分解によって間質空間にチャンネルを開ける能力によって、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与が、分子の拡散を可能にし、それによって、同時に処方される、または同時に投与される分子の、またはヒアルロニダーゼの投与後に投与される分子のバイオアベイラビリティ、薬物動態および／または薬力学的特徴を改善する。いくつかの例では、ヒアルロニダーゼを伴う分子のバイオアベイラビリティは、ヒアルロニダーゼ投与を伴わない分子のバイオアベイラビリティの70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%である。一般に、バイオアベイラビリティは、90%を超える。さらに、上記で論じたように、修飾されたヒアルロナン分解酵素をはじめとするヒアルロナン分解酵素は、その他の機構によって腫瘍を治療できる。

30

40

【0177】

したがって、一例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療は、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼのような修飾されたヒアルロナン分解酵素と、疾患または障害を治療するための1種または複数のさらなる薬剤および／または治療、例えば、化学療法などの抗癌剤、癌を治療するための抗体、ベクターまたは核酸とを含有する組成物の投与を含む。この例では、第2の治療または薬剤を、ヒアルロニダーゼと別個に、または一緒に投与できる。例えば、修飾されたヒアルロナン分解酵素を、さらなる薬剤または治療の前、後またはそれとともに投与する。したがって、ヒアルロナン分解酵素、特に、PEG化

50

可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素は、単独で、またはその他の治療薬と組み合わせて治療薬として投与できる。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、投与は、特に、細胞外ヒアルロナンの高発現を有する組織、例えば、HALO（ヒアルロナンをはじめとするプロテオグリカンが豊富である細胞周囲マトリックス領域）形成を示す組織への治療または薬剤のデリバリーのための、例えば静脈内、皮下および／または腫瘍内デリバリーによる治療薬デリバリーを促進し得る。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の、細胞外マトリックスにおいてヒアルロナンを分解する能力のために、ヒアルロナン分解酵素は、所望の位置への治療薬の投与を容易にする。

【0178】

通常、第2の薬剤および修飾されたヒアルロナン分解酵素、例えば、修飾されたヒアルロニダーゼ酵素は、別個に投与される。例えば、さらなる薬剤または治療は、任意の順序で同時に、逐次、または断続的に投与してよい。通常、ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素を、さらなる薬剤および／または治療に先立って、例えば、さらなる薬剤または治療に少なくとも0.5、1、5、15、もしくは30分、または1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、24、36、48、72もしくはそれ以上の時間先立って投与する。いくつかの例では、修飾された酵素の長い半減期およびその作用期間のために、修飾された酵素を、さらなる薬剤または治療の投与に少なくとも24もしくは約24時間、少なくとも48もしくは約48時間、または少なくとも72もしくは約72時間またはそれ以上先立って投与してもよい。

【0179】

第2の薬剤の投与頻度は経験的に決定できる。投与頻度の決定は、熟練した医師のレベルの範囲内であり、治療されている個々の疾患または状態、疾患の重篤度、治療される患者、および修飾された酵素の投与の周期をはじめとするいくつかの因子に応じて変わる。一般に、第2の薬剤、例えば、抗癌剤または治療（例えば、化学療法薬）の投与のタイミングは、通常、修飾された酵素の投与の周期の関数である。例えば、第2の薬剤は、投与の周期中、修飾された酵素の第1の投与後に、および／または周期中、任意の1回または複数のその後の投与の後に投与してよい。その他の例では、第2の薬剤を、周期中、修飾された酵素のその後の各投与の後に、周期中、修飾された酵素のその後の投与の1回おきの後に投与する、または修飾された酵素の投与の周期の間、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回または1カ月に1回投与する。いくつかの例では、第2の薬剤を修飾された酵素の投与の1周期あたり1回投与するだけである。さらなる例では、第2の薬剤を、投与の周期間で断続的に投与する。例えば、第2の薬剤を、第1の投与の周期の間は投与しないが、第2の周期の間は投与し、続いて、第3の周期を飛ばして、第4の周期の間に再度投与するなど、またはその任意の変法で投与する。

【0180】

以下の節は、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素および／またはその他の薬剤を含有する例示的組成物および化合物、その製造方法、およびヒアルロナン関連疾患、障害および状態を治療するためのその使用方法を記載する。

【0181】

C. ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物

修飾されたヒアルロナン分解酵素、特に、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物、およびヒアルロナン関連疾患および状態の治療のために投与するためのこのような組成物を使用する方法が、本明細書において提供される。本明細書において提供される組成物中に含有されるヒアルロナン分解酵素は、ポリマー（例えば、PEG）とのコンジュゲーションによって修飾される。酵素がヒアルロン酸に対する酵素活性（例えば、ヒアルロニダーゼ活性）を示す限り、任意のこのような修飾されたヒアルロナン分解酵素をここで使用できる。いくつかの例では、本明細書における方法、組成物および組合せにおいて使用される修飾されたヒアルロナン分解酵素は、修飾されていないヒアルロナン分解酵素（例えば、ポリマーとコンジュゲートされていない）と比較して増大されたヒアルロニダーゼ活性を示す。全般的に、本明細書において別に論じられるように、修飾されたヒアルロナン

分解酵素は、修飾されていないヒアルロナン分解酵素と比較して増大された半減期を示す。

【0182】

ヒアルロナンはまた、ヒアルロン酸もしくはヒアルロネートとも呼ばれ、結合組織、上皮組織および神経組織中に広く分布している非硫酸化グリコサミノグリカンである。ヒアルロナンは、細胞外マトリックスの必須成分であり、間質バリアの主要な成分である。ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナンの加水分解を触媒することによって、ヒアルロナンの粘度を低下させ、それによって、組織透過性を増大し、非経口的に投与された流体の吸収速度を高める。そのようなものとして、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、例えば、その他の薬剤、薬物およびタンパク質とともに、その分散およびデリバリーを増強するための展着剤または分散剤として使用されてきた。

10

【0183】

ヒアルロナン分解酵素は、交互の $\beta-1 \rightarrow 4$ および $\beta-1 \rightarrow 3$ グリコシド結合によって一緒になって連結している反復性二糖単位、D-グルクロン酸 (GlcA) および N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) からなる、ヒアルロナンポリマーを切断することによってヒアルロナンを分解するよう作用する。ヒアルロナン鎖は、約 25,000 の二糖反復またはそれ以上の長さに達する場合があります、ヒアルロナンのポリマーは、*in vivo* で約 5,000 ~ 20,000,000 Da の大きさの範囲であり得る。したがって、提供される使用および方法のためのヒアルロナン分解酵素として、ヒアルロナン二糖鎖またはポリマーの切断を触媒する能力を有する任意の酵素が挙げられる。いくつかの例では、ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナン鎖またはポリマー中の $\beta-1 \rightarrow 4$ グリコシド結合を切断する。その他の例では、ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロナン鎖またはポリマー中の $\beta-1 \rightarrow 3$ グリコシド結合の切断を触媒する。

20

【0184】

したがって、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、細胞外マトリックスの必須成分であり、間質バリアの主要な成分であるヒアルロン酸を分解する酵素のファミリーである。ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロン酸、間質バリアの主要な成分の加水分解を触媒することによって、ヒアルロン酸の粘度を低下させ、それによって組織透過性を増大する。そのようなものとして、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、例えば、その他の薬剤、薬物およびタンパク質とともに、その分散およびデリバリーを増強するための展着剤または分散剤として使用されてきた。ヒアルロナン分解酵素はまた、皮下点滴療法 (皮下流体投与) のためのその他の注射薬の吸収および分散を増大するためのアダプタントとして、また、放射不透過剤の吸収を改善するための皮下尿路造影における補助剤として使用される。ヒアルロナン分解酵素、例えば、ヒアルロニダーゼは、眼部手順、例えば、眼部手術に先立つ局所麻酔における眼球周囲およびテノン嚢下ブロックの適用において使用できる。ヒアルロニダーゼはまた、例えば、眼瞼形成術および頬部除皺術などの美容整形において無動を促進することによって、その他の治療的使用および化粧の使用において使用できる。

30

【0185】

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素の種々の形態は、ヒトを含めた対象における治療的使用のために調製され、認可されている。提供された組成物および方法は、これらおよびその他の治療的使用によって、ヒアルロナン関連疾患および状態を治療するために使用できる。例えば、動物由来ヒアルロニダーゼ調製物として、Vitrase (登録商標) (ISTA Pharmaceuticals)、精製ヒツジ精巢ヒアルロニダーゼおよび Amphadase (登録商標) (Amphastar Pharmaceuticals)、ウシ精巢ヒアルロニダーゼが挙げられる。Hyalenex (登録商標) (Halozyme Therapeutics) は、可溶性 rHuPH20 をコードする核酸を含有する遺伝子操作されたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞によって産生されるヒト組換えヒアルロニダーゼである。

40

【0186】

50

本明細書において提供される組成物および方法では、ヒアルロナン分解酵素の例示的なものとして、可溶性ヒアルロニダーゼがある。その他の例示的ヒアルロナン分解酵素として、それだけには限らないが、特定のコンドロイチナーゼおよびヒアルロナンを切断する能力を有するリアーゼが挙げられる。

【0187】

以下に記載されるように、ヒアルロナン分解酵素は、膜結合型または可溶性型で存在する。本明細書における目的上、可溶性ヒアルロナン分解酵素は、本明細書における方法、使用、組成物または組合せにおける使用のために提供される。したがって、ヒアルロナン分解酵素が、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを含む、および／または別の方法で膜に固定されている、もしくは不溶性である場合には、ヒアルロナン分解酵素は、本明細書において不溶性型で提供される。したがって、ヒアルロナン分解酵素は、末端切断型変異体、例えば、GPIアンカーのすべてまたは一部を除去するよう末端切断されたものを含む。本明細書において提供される（provide）ヒアルロナン分解酵素はまた、可溶性ヒアルロナン分解酵素の対立遺伝子または種変異体またはその他の変異体を含む。例えば、ヒアルロナン分解酵素は、その一次配列中に、アミノ酸置換、付加および／または欠失などの1つまたは複数の変異を含有し得る。ヒアルロナン分解酵素の変異体は、通常、変異を含有しないヒアルロナン分解酵素と比較して少なくともまたは約60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示す。本明細書における目的上、酵素が、変異を含有しないヒアルロナン分解酵素の活性の少なくともまたは約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上などのヒアルロニダーゼ活性を保持する限り（当技術分野で公知であり、本明細書に記載される *in vitro* および／または *in vivo* アッセイによって測定される）、ヒアルロナン分解酵素中に任意の変異が含まれてもよい。

【0188】

本明細書において提供される方法および使用が、可溶性ヒアルロニダーゼの使用を記載する場合には、それに応じて、任意のヒアルロナン分解酵素、通常、可溶性ヒアルロナン分解酵素を使用できる。

【0189】

1. ヒアルロニダーゼ

ヒアルロニダーゼは、ヒアルロナン分解酵素の大きなファミリーのメンバーである。3つの一般的なクラスのヒアルロニダーゼ：哺乳類種ヒアルロニダーゼ、細菌ヒアルロニダーゼならびにヒル、その他の寄生生物および甲殻類に由来するヒアルロニダーゼがある。このような酵素は、提供される組成物、組合せおよび方法において使用できる。

【0190】

a. 哺乳類種ヒアルロニダーゼ

哺乳類種ヒアルロニダーゼ（EC 3. 2. 1. 35）は、ヒアルロナンの β -1 $\rightarrow$ 4 グリコシド結合を、四糖および六糖などの種々のオリゴ糖の長さに加水分解するエンド- β -N-アセチル-ヘキソサミニダーゼである。これらの酵素は、加水分解活性およびトランスグリコシダーゼ活性の両方を有し、ヒアルロナンおよびコンドロイチン硫酸（CS）、通常、C4-SおよびC6-Sを分解できる。この種のヒアルロニダーゼとして、それだけには限らないが、雌ウシ（ウシ）（配列番号10、11および64およびBH55（米国特許第5,747,027号および同5,827,721号））、ヒツジ（ヒツジ（*ovis aries*））（配列番号26、27、63および64）、イエロージャケットワスプ（*yellow jacket wasp*）（配列番号12および13）、ミツバチ（配列番号14）、ホワイトフェースホーネット（*white-face hornet*）（配列番号15）、アシナガバチ（*paper wasp*）（配列番号16）、マウス（配列番号17~19、31）、ブタ（配列番号20~21）、ラット（配列番号22~24、30）、ウサギ（配列番号25）、オランウータン（配列番号28）、カニ

クイザル（配列番号29）、モルモット（配列番号32）由来のヒアルロニダーゼおよびヒトヒアルロニダーゼが挙げられる。本明細書において提供される組成物、組合せおよび方法におけるヒアルロニダーゼの例示的はものとして、可溶性ヒアルロニダーゼがある。

【0191】

哺乳類ヒアルロニダーゼは、主に精巣抽出物中に見られる中性で活性であるもの、および主に肝臓などの臓器で見られる酸性で活性なものにさらに細分できる。例示的な中性で活性なヒアルロニダーゼとして、それだけには限らないが、ヒツジ（配列番号27）、ウシ（配列番号11）およびヒト（配列番号1）などの種々の種に由来するPH20をはじめとするPH20が挙げられる。ヒトPH20（SPAM1または精子表面タンパク質PH20としても知られる）は、通常、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを介して細胞膜と結合している。精子-卵子接着に天然に関与しており、ヒアルロン酸を消化することによって卵丘細胞の層の精子による浸透を補助する。

【0192】

ヒトPH20（SPAM1とも呼ばれる）に加えて、ヒトゲノムでは5種のヒアルロニダーゼ様遺伝子が同定されている、HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4およびHYALP1。HYALP1は、偽遺伝子であり、HYAL3（配列番号38）は、任意の既知基質に対する酵素活性を有するとはわかっていない。HYAL4（配列番号39に示される前駆体ポリペプチド）は、コンドロイチナーゼであり、ヒアルロン酸に対して活性をほとんど示さない。HYAL1（配列番号36に示される前駆体ポリペプチド）は、原型的酸性活性な酵素であり、PH20（配列番号1に示される前駆体ポリペプチド）は、原型的中性活性な酵素である。HYAL1およびHYAL2（配列番号37に示される前駆体ポリペプチド）などの酸性で活性なヒアルロニダーゼは、通常、中性pH（すなわち、pH7）で触媒活性を欠く。例えば、HYAL1は、pH4.5を上回ってin vitroで触媒活性をほとんど有さない(Frost et al. (1997) Anal. Biochem. 251: 263-269)。HYAL2は、in vitroで極めて低い比活性を有する酸性で活性な酵素である。ヒアルロニダーゼ様酵素はまた、通常、ヒトHYAL2およびヒトPH20などのグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを介して細胞膜と結合しているもの(Danilkovitch-Miagkova, et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100(8):45 80-5)、およびヒトHYAL1などの通常、可溶性であるもの(Frost et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-5)を特徴とし得る。

【0193】

PH20

PH20は、その他の哺乳類ヒアルロニダーゼと同様に、ヒアルロン酸の $\beta 1 \rightarrow 4$ グリコシド結合を、四糖および六糖などの種々のオリゴ糖の長さに加水分解するエンド- β -N-アセチル-ヘキソサミニダーゼである。それらは、加水分解活性およびトランスグリコシダーゼ活性の両方を有し、ヒアルロン酸ならびにC4-SおよびC6-Sなどのコンドロイチン硫酸を分解できる。PH20は、精子-卵子接着に天然に関与しており、ヒアルロン酸を消化することによって卵丘細胞の層の精子による浸透を補助する。PH20は、精子表面に、およびリソソーム由来先体中に位置し、ここで、先体内膜と結合している。細胞膜PH20は、中性pHでのみヒアルロニダーゼ活性を有するが、先体内膜PH20は、中性および酸性pHの両方で活性を有する。PH20は、ヒアルロニダーゼであることに加え、HA誘導性細胞シグナル伝達の受容体および卵母細胞を囲む透明帯の受容体でもあると思われる。

【0194】

例示的PH20タンパク質として、それだけには限らないが、ヒト（配列番号1に示される前駆体ポリペプチド、配列番号2に示される成熟ポリペプチド）、チンパンジー（配列番号101）、アカゲザル（配列番号102）ウシ（配列番号11および64）、ウサギ（配列番号25）、ヒツジPH20（配列番号27、63および65）、カニクイザル（配列番号29）、モルモット（配列番号32）、ラット（配列番号30）およびマウス（配列番号31）PH20ポリペプチドが挙げられる。

【0195】

ウシPH20は、553個のアミノ酸の前駆体ポリペプチド（配列番号11）である。ウシPH20の、ヒトPH20とのアラインメントは、ウシポリペプチド中にGPIアンカーがないために、弱い相同性しか示さず、アミノ酸470からそれぞれのカルボキシ末端に複数のギャップが存在する（例えば、Frost GI (2007) Expert Opin. Drug. Deliv. 4: 427-440参照）。実際、ヒト以外の多数のその他のPH20種では明確なGPIアンカーは、予測されない。したがって、ヒツジおよびウシから産生されるPH20ポリペプチドは、可溶性型として天然に存在する。ウシPH20は、細胞膜と極めて緩く結合して存在するが、ホスホリパーゼ感受性アンカーを介して固定されていない(Lalancette et al. (2001) Biol Reprod. 65(2):628-36)。ウシヒアルロニダーゼのこの独特の特徴によって、臨床使用のための抽出物としての可溶性ウシ精巢ヒアルロニダーゼ酵素の使用が可能となっている（Wydase（登録商標）、Hyalase（登録商標））。

10

【0196】

ヒトPH20 mRNA転写物は、正常に翻訳されて、N末端（アミノ酸残基位置1～35）に35個のアミノ酸のシグナル配列およびC末端（アミノ酸残基位置491～509）に19個のアミノ酸のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー付着シグナル配列を含有する、509個のアミノ酸の前駆体ポリペプチド（配列番号1）を生成する。したがって、成熟PH20は、配列番号2に示される474個のアミノ酸ポリペプチドである。ERへの前駆体ポリペプチドの輸送およびシグナルペプチドの除去後、C末端GPI付着シグナルペプチドが切断されて、配列番号1に示される前駆体ポリペプチドの位置490に対応するアミノ酸位置に新規に形成されるC末端アミノ酸とのGPIアンカーの共有結合が容易になる。したがって、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する、474個のアミノ酸のGPIで固定された成熟ポリペプチドが生じる。

20

【0197】

ヒトPH20は、中性および酸性pHの両方でヒアルロニダーゼ活性を示す。一態様では、ヒトPH20は、通常、GPIアンカーを介して細胞膜に固定されている、原型的中性で活性なヒアルロニダーゼである。別の態様では、PH20は、先体内膜上に発現され、ここでは、中性および酸性pHの両方でヒアルロニダーゼ活性を有する。PH20は、ポリペプチドの別個の領域に2つの触媒部位：ペプチド1およびペプチド3領域を含むと思われる(Cherr et al. (2001) Matrix Biology 20:515-525)。証拠は、配列番号2に示される成熟ポリペプチドのアミノ酸位置107～137および配列番号1に示される前駆体ポリペプチドの位置142～172に対応するPH20のペプチド1領域が、中性pHでの酵素活性にとって必要であるということを示唆する。この領域内の位置111および113のアミノ酸（配列番号2に示される成熟PH20ポリペプチドに対応する）は、アミノ酸置換による突然変異誘発が、野生型PH20と比較してそれぞれ、3%ヒアルロニダーゼ（hyaluronidase）活性または検出できないヒアルロニダーゼ活性を有するPH20ポリペプチドをもたらすので、活性にとって重要であると思われる(Armstrong et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814)。

30

【0198】

配列番号2に示される成熟ポリペプチドのアミノ酸位置242～262、および配列番号1に示される前駆体ポリペプチドの位置277～297に対応するペプチド3領域は、酸性pHでの酵素活性にとって重要であると思われる。この領域内で、成熟PH20ポリペプチドの位置249および252のアミノ酸が、活性にとって必須であると思われ、いずれかの一方の突然変異誘発が、本質的に活性を欠いているポリペプチドをもたらす(Armstrong et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814)。

40

【0199】

PH20はまた、触媒部位に加え、ヒアルロナン結合部位を含む。実験的証拠により、この部位は、ペプチド2領域中に位置しており、配列番号1に示される前駆体ポリペプチドのアミノ酸位置205～235および配列番号2に示される成熟ポリペプチドの位置170～200に対応するということが示唆される。この領域は、ヒアルロニダーゼ間で高

50

度に保存されており、ヘパリン結合モチーフと類似している。位置176のアルギニン残基（配列番号2に示される成熟PH20ポリペプチドに対応する）の、グリシンへの突然変異は、野生型ポリペプチドのヒアルロニダーゼ活性の約1%しか有さないポリペプチドをもたらす(Arming et al., (1997) Eur. J. Biochem. 247:810-814)。

【0200】

配列番号1に示されるポリペプチドのN82、N166、N235、N254、N368、N393、N490に、ヒトPH20中の7つの潜在的なN結合型グリコシル化部位がある。配列番号1のアミノ酸36～464は、最小に活性なヒトPH20ヒアルロニダーゼドメインを含むようであるので、N結合型グリコシル化部位N-490は、適切なヒアルロニダーゼ活性にとって必要ではない。ヒトPH20中には、6つのジスルフィド結合がある。配列番号1に示されるポリペプチドのシステイン残基C60とC351間およびC224とC238間の2つのジスルフィド結合（それぞれ、配列番号2に示される成熟ポリペプチドの残基C25とC316、およびC189とC203に対応する）。さらなる4つのジスルフィド結合が、配列番号1に示されるポリペプチドのシステイン残基C376とC387の間；C381とC435の間；C437とC443の間；およびC458とC464の間に形成される（それぞれ、配列番号2に示される成熟ポリペプチドの残基C341とC352；C346とC400の間；C402とC408の間；およびC423とC429の間に対応する）。

【0201】

b. 細菌ヒアルロニダーゼ

細菌ヒアルロニダーゼ（EC4.2.2.1またはEC4.2.99.1）は、ヒアルロナンを種々の程度に、コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸を分解する。細菌から単離されたヒアルロナンリアーゼは、その作用様式によってヒアルロニダーゼ（その他の供給源に由来する、例えば、ヒアルロノグルコサミニダーゼ、EC3.2.1.35）とは異なる。それらは、ヒアルロナン中のN-アセチル-β-D-グルコサミンとD-グルクロン酸残基間のβ1→4-グリコシド結合の加水分解ではなく、排出反応を触媒するエンド-β-N-アセチルヘキソサミニダーゼであり、3-（4-デオキシ-β-D-グルカ-4-エヌロシル）-N-アセチル-D-グルコサミン四糖および六糖、ならびに二糖最終産物を生じる。この反応は、その非還元末端に不飽和ヘキスロン酸残基を有するオリゴ糖の形成をもたらす。

【0202】

提供される組成物、組合せおよび方法において使用するための細菌由来の例示的ヒアルロニダーゼとして、それだけには限らないが、アルスロバクター（*Arthrobacter*）、デロビブリオ（*Bdellovibrio*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、マイクロコッカス（*Micrococcus*）、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）、ペプトコッカス（*Peptococcus*）、プロピオニバクテリウム（*Propionibacterium*）、バクテロイド（*Bacteroides*）およびストレプトマイセス（*Streptomyces*）の株をはじめとする微生物中のヒアルロナン分解酵素が挙げられる。このような酵素の特定の例として、それだけには限らないが、アルスロバクター種（FB24株）（配列番号67）、デロビブリオ・バクテリオボラス（*Bdellovibrio bacteriovorus*）（配列番号68）、アクネ菌（*Propionibacterium acnes*）（配列番号69）、ストレプトコッカス・アガラクチエ（*Streptococcus agalactiae*）（配列番号70）；18RS21（配列番号71）；血清型Ia（配列番号72）；血清型III（配列番号73）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）（COL株（配列番号74）；MRSA252株（配列番号75および76）；MSSA476株（配列番号77）；NCTC8325株（配列番号78）；ウシRF122株（配列番号79および80）；USA300株（配列番号81）、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）（配列番号82）；ATCC BAA-255/R6株（配列番号83）；血清型2、D39/NCTC746

6株（配列番号84）、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）（血清型M1）（配列番号85）；血清型M2、MGAS10270株（配列番号86）；血清型M4、MGAS10750株（配列番号87）；血清型M6（配列番号88）；血清型M12、MGAS2096株（配列番号89および90）；血清型M12、MGAS9429株（配列番号91）；血清型M28（配列番号92）；ブタ連鎖球菌（*Streptococcus suis*）（配列番号：93～95）；ビブリオ・フィシェリ（*Vibrio fischeri*）（ATCC 700601/ES114株（配列番号96））、およびヒアルロン酸に特異的であり、コンドロイチンまたはコンドロイチン硫酸を切断しないストレプトマイセス・ヒアルロノリチクス（*Streptomyces hyaluronolyticus*）ヒアルロニダーゼ酵素(Ohya, T. and Kaneko, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198:607)が挙げられる。

10

【0203】

c. ヒル、その他の寄生生物および甲殻類に由来するヒアルロニダーゼ

ヒル、その他の寄生生物、および甲殻類由来のヒアルロニダーゼ（EC3.2.1.36）は、四糖および六糖最終産物を生成するエンド-β-グルクロニダーゼである。これらの酵素は、ヒアルロネート中のβ-D-グルクロネートおよびN-アセチル-D-グルコサミン残基間の1→3結合の加水分解を触媒する。ヒル由来の例示的ヒアルロニダーゼとして、それだけには限らないが、ヒルド科（*Hirudinidae*）（例えば、ヒルド・メディシナリス（*Hirudo medicinalis*））、イシビル科（*Erpobdellidae*）（例えば、ネフェロプシス・オブスクラ（*Nephelopsis obscura*）およびエルポデラ・プンクタタ（*Erpobdella punctata*））、グロシフォニ科（*Glossiphoniidae*）（例えば、デセロデラ・ピクタ（*Desserobdella picta*）、ヘロデラ・スタグナリス（*Helobdella stagnalis*）、グロシフォニア・コンプラナタ（*Glossiphonia complanata*）、プラコデラ・オルナタ（*Placobdella ornata*）およびテロミゾン（*Theromyzon*）種）およびヘモピ科（*Haemopidae*）（ヘモピス・マルモラタ（*Haemopis marmorata*））（Hovingh et al. (1999) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 124(3):319-26)由来のヒアルロニダーゼが挙げられる。ヒルヒアルロニダーゼと同一の作用機序を有する細菌由来の例示的ヒアルロニダーゼとして、シアノバクテリア、シネココッカス（*Synechococcus*）種（RCC307株、配列番号97）由来のものがある。

20

30

【0204】

2. その他のヒアルロナン分解酵素

提供される組成物、組合せおよび方法において、ヒアルロニダーゼファミリーに加えて、その他のヒアルロナン分解酵素を使用できる。例えば、ヒアルロナンを切断する能力を有する、特定のコンドロイチナーゼおよびリアーゼを含めた酵素を使用できる。ヒアルロナンを分解できる例示的コンドロイチナーゼとして、それだけには限らないが、コンドロイチンABCリアーゼ（コンドロイチナーゼABCとしても知られる）、コンドロイチンACリアーゼ（コンドロイチン硫酸リアーゼまたはコンドロイチン硫酸エリミナーゼとしても知られる）およびコンドロイチンCリアーゼが挙げられる。提供される組成物、組合せ、および方法において使用するためのこのような酵素の製造および精製方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許第6,054,569号；Yamagata, et al. (1968) J. Biol. Chem. 243(7):1523-1535; Yang et al. (1985) J. Biol. Chem. 160(30):1849-1857）。

40

【0205】

コンドロイチンABCリアーゼは、2種の酵素、コンドロイチン硫酸-ABCエンドリアーゼ（EC4.2.2.20）およびコンドロイチン硫酸-ABCエキソリアーゼ（EC4.2.2.21）（Hamai et al. (1997) J Biol Chem. 272(14):9123-30)を含み、コンドロイチン硫酸型の、およびデルマタン硫酸型の種々のグリコサミノグリカンを分解する。コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンおよびデルマタン硫酸が

50

、コンドロイチン硫酸－A B C エンドリアーゼの好ましい基質であるが、この酵素はまた、少ない割合でヒアルロナンにも作用し得る。コンドロイチン硫酸－A B C エンドリアーゼは、コンドロイチン硫酸型およびデルマタン硫酸型の種々のグリコサミノグリカンを分解し、最終的に $\Delta 4$ －不飽和四糖および二糖に分解される、種々の大きさの $\Delta 4$ －不飽和オリゴ糖の混合物を生成する。コンドロイチン硫酸－A B C エキシリアーゼは、同じ基質特異性を有するが、ポリマーのコンドロイチン硫酸およびコンドロイチン硫酸－A B C エンドリアーゼによって生じたそのオリゴ糖断片両方の非還元末端から二糖残基を除去する(Hamai, A. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9123-9130)。例示的コンドロイチン硫酸－A B C エンドリアーゼおよびコンドロイチン硫酸－A B C エキシリアーゼとして、それだけには限らないが、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*) およびフラボバクテリウム・ヘパリナム (*Flavobacterium heparinum*) に由来するものが挙げられる (プロテウス・ブルガリスコンドロイチン硫酸－A B C エンドリアーゼが、配列番号 98 に示される (Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41(1):39-46))。 10

【0206】

コンドロイチン A C リアーゼ (E C 4. 2. 2. 5) は、コンドロイチン硫酸 A および C、コンドロイチンおよびヒアルロン酸に対して活性であるが、デルマタン硫酸 (コンドロイチン硫酸 B) に対しては活性でない。細菌由来の例示的コンドロイチナーゼ A C 酵素として、それだけには限らないが、それぞれ、配列番号 99 および 100 に示される、フラボバクテリウム・ヘパリナムおよびビクチバリス・バデンシス (*Victivallis vadensis*) 由来のもの、およびアルスロバクター・アウレッセンス (*Arthrobacter aureescens*) 由来のものが挙げられる (Tkalec et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology 66(1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444)。 20

【0207】

コンドロイチナーゼ C は、コンドロイチン硫酸 C を切断して、四糖および不飽和 6 硫酸化二糖 (デルタ D i - 6 S) を生成する。コンドロイチナーゼ C は、ヒアルロン酸も切断し、不飽和非硫酸化二糖 (デルタ D i - O S) を生成する。細菌由来の例示的コンドロイチナーゼ C 酵素として、それだけには限らないが、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) およびフラボバクテリウム (*Flavobacterium*) に由来するものが挙げられる (Hibi et al. (1989) FEMS-Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci et al. (1976) J. Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133)。 30

【0208】

3. 可溶性ヒアルロナン分解酵素

本明細書における組成物、組合せ、使用および方法において提供されるものとして、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼを含めた修飾された可溶性ヒアルロナン分解酵素がある。可溶性ヒアルロナン分解酵素として、それだけには限らないが、非ヒト動物可溶性ヒアルロニダーゼ、細菌可溶性ヒアルロニダーゼおよびヒトヒアルロニダーゼ、H y a l 1、ウシ P H 2 0 およびヒツジ P H 2 0、その対立遺伝子変異体およびそのその他の変異体をはじめとする非ヒト可溶性ヒアルロニダーゼを含めた可溶性ヒアルロニダーゼをはじめとする可溶性型で存在する任意のヒアルロナン分解酵素が挙げられる。例えば、可溶性ヒアルロナン分解酵素の中には、可溶性であるよう修飾されている任意のヒアルロナン分解酵素が含まれる。例えば、G P I アンカーを含むヒアルロナン分解酵素は、G P I アンカーのすべてまたは一部を末端切断することおよび除去することによって可溶性にできる。一例では、通常、G P I アンカーを介して膜に固定されているヒトヒアルロニダーゼ P H 2 0 を、C 末端の G P I アンカーのすべてまたは一部を末端切断することおよび除去することによって可溶性にできる。 40

【0209】

可溶性ヒアルロナン分解酵素はまた、中性で活性なおよび酸性で活性なヒアルロニダー 50

ゼも含む。中性で活性なおよび酸性で活性なヒアルロニダーゼは、それだけには限らないが、投与後の酵素の活性の所望のレベルおよび／または投与部位などの因子に応じて選択することができる。特定の例では、本明細書における組成物、組合せおよび方法において使用するためのヒアルロナン分解酵素は、可溶性の中性で活性なヒアルロニダーゼである。

【0210】

可溶性ヒアルロニダーゼの例示的なものとして、ヒアルロニダーゼが可溶性であり、ヒアルロニダーゼ活性を保持する限り、配列番号1、2、11、25、27、30、31、63～65および101～102のいずれかに示される任意のもの、またはC末端GPIアンカーのすべてもしくは一部を欠くその末端切断型など、任意の種に由来するPH20がある。また、可溶性ヒアルロニダーゼの中には、配列番号1、2、11、25、27、30、31、63～65および101～102のいずれか、またはその末端切断型の対立遺伝子変異体またはその他の変異体が含まれる。対立遺伝子変異体およびその他の変異体は、当業者に公知であり、配列番号1、2、11、25、27、30、31、63～65および101～102のいずれかと60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドまたはその末端切断型が挙げられる。アミノ酸変異体は、保存的および非保存的突然変異を含む。上記のいずれかまたは当業者に公知のものなどのヒアルロニダーゼの活性にとって重要であるか、そうではなく必要である残基は、通常、不変であるか、変更できないということは理解される。これらとして、例えば、活性部位残基が挙げられる。したがって、例えば、ヒトPH20ポリペプチド、またはその可溶性型のアミノ酸残基111、113および176（配列番号2に示される成熟PH20ポリペプチド中の残基に対応する）は、通常、不変であるか変更されていない。適切なフォールディングにとって必要なグリコシル化およびジスルフィド結合の形成をもたらすその他の残基も、不変であり得る。

【0211】

いくつかの例では、可溶性ヒアルロナン分解酵素は、通常、GPIによって固定されており（例えば、ヒトPH20など）、C末端での末端切断によって可溶性にされる。このような末端切断は、GPIアンカー付着シグナル配列のすべてを除去してもよく、またはGPIアンカー付着シグナル配列の一部のみを除去してもよい。しかし、得られたポリペプチドは可溶性である。可溶性ヒアルロナン分解酵素がGPIアンカー付着シグナル配列の一部を保持する場合には、ポリペプチドが可溶性である限り、GPIアンカー付着シグナル配列中の1、2、3、4、5、6、7個またはそれ以上のアミノ酸残基が保持され得る。GPIアンカーの1個または複数のアミノ酸を含有するポリペプチドは、延長された可溶性ヒアルロナン分解酵素と呼ばれる。当業者ならば、当技術分野で周知の方法を使用して、ポリペプチドがGPIによって固定されているかどうかを容易に決定できる。このような方法として、それだけには限らないが、GPIアンカー付着シグナル配列およびω部位の存在および位置を予測する既知アルゴリズムを使用することおよびホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC（PI-PLC）またはD（PI-PLD）を用いて消化の前後に溶解度分析を実施することが挙げられる。

【0212】

延長された可溶性ヒアルロナン分解酵素は、得られるポリペプチドが、可溶性であり、GPIアンカー付着シグナル配列に由来する1個または複数のアミノ酸残基を含有するように、任意の天然にGPIによって固定されたヒアルロナン分解酵素にC末端末端切断を行うことによって製造できる。C末端で末端切断されているが、GPIアンカー付着シグナル配列の一部を保持する、例示的な延長された可溶性ヒアルロナン分解酵素として、それだけには限らないが、例えば、ヒトおよびチンパンジーesPH20ポリペプチドなどの、霊長類起源の延長された可溶性PH20（esPH20）ポリペプチドが挙げられる。例えば、esPH20ポリペプチドは、配列番号1、2または101に示される成熟または前駆体ポリペプチドのいずれか、またはその対立遺伝子もしくはその活性な断片を含

めたその他の変異体のC末端末端切断によって製造でき、得られるポリペプチドは、可溶性であり、GPIアンカー付着シグナル配列由来の1個または複数のアミノ酸残基を保持する。対立遺伝子変異体およびその他の変異体は、当業者に公知であり、配列番号1または2のいずれかと60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、得られるesPH20ポリペプチドが可溶性であり、GPIアンカー付着シグナル配列に由来する1個または複数のアミノ酸残基を保持する限り、配列番号1、2または101に示される配列を有するポリペプチドなどの野生型ポリペプチドと比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のアミノ酸がC末端で末端切断され得る。

10

【0213】

通常、本明細書における組成物、組合せおよび方法において使用するために、可溶性ヒトPH20などの可溶性ヒトヒアルロナン(hyaluronan)分解酵素が使用される。その他の動物由来のPH20などのヒアルロナン分解酵素を利用できるが、このような調製物は、それらが動物タンパク質であるので潜在的に免疫原性である。例えば、相当な割合の患者が、食物摂取に続発する事前感作を示し、これらが動物タンパク質であるので、すべての患者が後の感作の危険を有する。したがって、非ヒト調製物は、慢性使用には適したものでない場合がある。非ヒト調製物が望ましい場合には、このようなポリペプチドは、低減された免疫原性を有するよう調製できるということが本明細書において考慮される。このような修飾は、当業者のレベル内であり、例えば、分子上の1つまたは複数の抗原性エピトープの除去および／または置換を挙げることができる。

20

【0214】

本明細書における方法において使用されるヒアルロニダーゼ(例えば、PH20)を含めたヒアルロナン分解酵素は、組換えによって製造できる、または天然供給源から、例えば、精巢抽出物などから精製または部分精製できる。組換えヒアルロナン分解酵素をはじめとする組換えタンパク質を製造する方法は、本明細書において別の場所で提供され、当技術分野で周知である。

【0215】

a. 可溶性ヒトPH20

可溶性ヒアルロニダーゼの例示的なものとして、可溶性ヒトPH20がある。可溶性型の組換えヒトPH20が製造されており、本明細書に記載される組成物、組合せおよび方法において使用できる。このような可溶性型のPH20の製造は、米国公開特許出願番号US20040268425;US20050260186およびUS20060104968に、および以下の実施例に記載されている。例えば、可溶性PH20ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸の配列を含む、または配列番号1に含まれるアミノ酸の配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%、98%の配列同一性を有するC末端で末端切断された変異体ポリペプチドを含み、ヒアルロニダーゼ活性を保持し、可溶性である。これらのポリペプチドの中には、GPIアンカー付着シグナル配列のすべてまたは一部を完全に欠く可溶性PH20ポリペプチドが含まれる。また、GPIアンカーの少なくとも1個のアミノ酸を含有する延長された可溶性PH20(esPH20)ポリペプチドも含まれる。したがって、これらのポリペプチドは、ERにおいてタンパク質のC末端と共有結合しているGPIアンカーを有し、細胞膜の細胞の外の単分子層に固定される代わりに、分泌され、可溶性である。C末端で末端切断されたPH20ポリペプチドは、配列番号1または2に示される配列またはその対立遺伝子または種変異体またはその他の変異体を有する全長野生型ポリペプチドなどの全長野生型ポリペプチドと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60個またはそれ以上のアミノ酸がC末端で末端切断され得る。

30

40

【0216】

本明細書において提供される例示的なC末端で末端切断されたヒトPH20ポリペプチ

50

ドとして、配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列の、アミノ酸 1 ～アミノ酸 465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497 の配列、またはその対立遺伝子または種変異体中の対応する位置を含有するポリペプチドを生じるような C 末端末端切断を有するいずれかのものが挙げられる。哺乳類細胞において発現される場合には、プロセシングの間に、35 個のアミノ酸の N 末端シグナル配列が切断され、成熟型のタンパク質が分泌される。したがって、例示的な成熟した C 末端で末端切断された可溶性 PH20 ポリペプチドは、配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列のアミノ酸 36 ～465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497 またはその対立遺伝子または種変異体中の対応する位置を含有し得る。表 2 は、C 末端で末端切断された可溶性 PH20 ポリペプチドを含めた例示的な C 末端で末端切断された PH20 ポリペプチドの限定されない例を提供する。以下の表 2 では、前駆体および成熟ポリペプチドの長さ（アミノ酸での）、ならびに C 末端で末端切断された PH20 タンパク質の前駆体および成熟ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が示される配列識別子（配列番号）が提供される。野生型 PH20 ポリペプチドもまた、比較のために表 2 に含まれる。

10

表 2. 例示的な C 末端で末端切断された PH20 ポリペプチド

20

【0217】

【表 2】

ポリペプチド	前駆体 (アミノ酸)	前駆体 配列番号	成熟 (アミノ酸)	成熟 配列番号
野生型	509	1	474	2
SPAM1-FIVS	497	107	462	151
SPAM1-MFIV	496	141	461	185
SPAM1-TMFI	495	108	460	152
SPAM1-ATM F	494	142	459	186
SPAM1-SAT M	493	109	458	153
SPAM1-LSAT	492	143	457	187
SPAM1-TLSA	491	110	456	154
SPAM1-PSTL	489	111	454	155
SPAM1-SPST	488	144	453	188
SPAM1-STLS	490	112	455	156
SPAM1-ASPS	487	113	452	157
SPAM1-NASP	486	145	451	189
SPAM1-YNA S	485	114	450	158
SPAM1-FYN A	484	115	449	159
SPAM1-IFYN	483	46	448	48
SPAM1-QIFY	482	3	447	4
SPAM1-PQIF	481	45	446	5
SPAM1-EPQI	480	44	445	6
SPAM1-EEPQ	479	43	444	7
SPAM1-TEEP	478	42	443	8
SPAM1-ETEE	477	41	442	9
SPAM1-MET E	476	116	441	160
SPAM1-PMET	475	117	440	161
SPAM1-PPME	474	118	439	162
SPAM1-KPP M	473	119	438	163
SPAM1-LKPP	472	120	437	164
SPAM1-FLKP	471	121	436	165
SPAM1-AFLK	470	122	435	166
SPAM1-DAFL	469	123	434	167
SPAM1-IDAF	468	124	433	168
SPAM1-CIDA	467	40	432	47
SPAM1-VCID	466	125	431	169
SPAM1-GVCI	465	126	430	170

【0218】

可溶性型として、それだけには限らないが、配列番号1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸1～アミノ酸467、477、478、479、480、481、482および483を含有するポリペプチドを生じるようなC末端末端切断を有するいずれかのものが挙げられる。哺乳類細胞において発現される場合には、プロセッシングの間に、35個のアミノ酸のN末端シグナル配列が切断され、成熟型のタンパク質が分泌される。したがって、成熟した可溶性ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸36～467、477、478、479、480、481、482および483を含有する。アミノ酸位置477～483で終わる（配列番号1に示される前駆体ポリペプチドに対応する）欠失突然変異体は、全長

の G P I によって固定される型よりも高い分泌型のヒアルロニダーゼ活性を示す。したがって、配列番号 4～9 のいずれかに示されるもの、またはその対立遺伝子または種変異体またはその他の変異体などの、442、443、444、445、446 または 447 個のアミノ酸長である可溶性ヒアルロニダーゼ可溶性ヒト P H 2 0 ポリペプチドの例示的なもの。

【0219】

グリコシル化が、ヒアルロニダーゼの触媒活性および安定性にとって重要であるので、可溶性型の P H 2 0 は、通常、ポリペプチドが活性を確実に保持するための正しい N-グリコシル化を促進するタンパク質発現系を使用して製造される。このような細胞として、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞 (例えば、D G 4 4 C H O 細胞) が挙げられる。

10

【0220】

b. r H u P H 2 0

組換え可溶性型ヒト P H 2 0 が作製されており、本明細書において提供される組成物、組合せおよび方法において使用できる。組換えヒト P H 2 0 のこのような可溶性型の作製は、米国公開特許出願番号 U S 2 0 0 4 0 2 6 8 4 2 5 ; U S 2 0 0 5 0 2 6 0 1 8 6 および U S 2 0 0 6 0 1 0 4 9 6 8 に、および以下の実施例 2～6 に記載されている。このようなポリペプチドの例示的なものとして、アミノ酸 1～482 (配列番号 3 に示される) をコードする核酸分子から作製したものがある。このような例示的核酸分子は、配列番号 49 に示されている。翻訳後プロセッシングによって、35 個のアミノ酸のシグナル配列が除去され、447 個のアミノ酸の可溶性組換えヒト P H 2 0 (配列番号 4) が残る。培養培地中で産生されるので、C 末端に不均一性があり、その結果、指定された r H u P H 2 0 は、配列番号 4～9 のうち任意の 1 種または複数を種々の存在量で含み得る種の混合物を含む。通常、r H u P H 2 0 は、活性を保持するよう正しい N-グリコシル化を促進する、C H O 細胞などの (例えば、D G 4 4 C H O 細胞) 細胞において産生される。

20

【0221】

4. ヒアルロナン分解酵素のグリコシル化

ヒアルロニダーゼを含めたいくつかのヒアルロナン分解酵素の N 結合型および O 結合型グリコシル化を含めたグリコシル化は、その触媒活性および安定性にとって重要であり得る。糖タンパク質を修飾するグリカンの種類を変更することは、タンパク質の抗原性、構造的フォールディング、溶解度および安定性に劇的な影響を有し得るが、ほとんどの酵素は、最適酵素活性にグリコシル化必要とすると考えられていない。一部のヒアルロニダーゼについて、N 結合型グリコシル化の除去が、ヒアルロニダーゼ活性のほぼ完全な不活性化をもたらし得る。したがって、このようなヒアルロニダーゼについては、N 結合型グリカンの存在が活性な酵素の作製にとって不可欠である。

30

【0222】

N 結合型オリゴ糖は、いくつかの主要な種類 (オリゴマンノース、複合体、ハイブリッド、硫酸化) に分類され、そのすべてが、-A s n-X a a-T h r / S e r-配列内に含まれる (ここで、X a a は P r o ではない) A s n 残基のアミド窒素を介して結合している (M a n) 3-G l c N A c-G l c N A c-コアを有する。-A s n-X a a-C y s-部位でのグリコシル化が、血液凝固タンパク質 C について報告されている。いくつかの例では、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、N-グリコシド結合および O-グリコシド結合の両方を含む。例えば、P H 2 0 は、O 結合型オリゴ糖ならびに N 結合型オリゴ糖を有する。配列番号 1 に例示されるヒト P H 2 0 の N 8 2、N 1 6 6、N 2 3 5、N 2 5 4、N 3 6 8、N 3 9 3、N 4 9 0 に、7 つの潜在的 N 結合型グリコシル化部位がある。上記のように、N 4 9 0 での N 結合型グリコシル化は、ヒアルロニダーゼ活性にとって必要ではない。

40

【0223】

いくつかの例では、提供される組成物、組合せおよび/または方法において使用するためのヒアルロナン分解酵素は、グリコシル化部位のうちの 1 つまたはすべてでグリコシル

50

化されている。例えば、ヒト PH 20 またはその可溶性型については、配列番号 1 のアミノ酸 N 8 2、N 1 6 6、N 2 3 5、N 2 5 4、N 3 6 8 および N 3 9 3 に相当する N-グリコシル化部位のうちの 2、3、4、5 または 6 つがグリコシル化されている。いくつかの例では、ヒアルロナン分解酵素は、1 つまたは複数の天然のグリコシル化部位でグリコシル化されている。その他の例では、ヒアルロナン分解酵素は、1 つまたは複数のさらなる部位でのポリペプチドのグリコシル化を付与するよう 1 つまたは複数の非天然グリコシル化部位で修飾される。このような例では、さらなる糖部分の結合は、半減期の改善および／または活性の改善など、分子の薬物動態特性を増強し得る。

【0224】

その他の例では、本明細書において提供される組成物、組合せおよび／または方法において使用するためのヒアルロナン分解酵素は、部分的に脱グリコシル化されている（または N-部分的グリコシル化ポリペプチド）。例えば、完全グリコシル化ヒアルロニダーゼのヒアルロニダーゼ活性のすべてはまた一部を保持する部分的に脱グリコシル化された可溶性 PH 20 ポリペプチドを、本明細書において提供される組成物、組合せおよび／または方法において使用できる。例示的部分脱グリコシル化ヒアルロニダーゼ (h y a l u r o d i n a s e s) として、配列番号 1、2、11、25、27、29、30、31、32、63、65、101 および 102 のいずれかに示されるいずれかなど、任意の種に由来する部分脱グリコシル化 PH 20 ポリペプチドまたはその対立遺伝子変異体、末端切断変異体またはその他の変異体の可溶性型が挙げられる。このような変異体は、当業者に公知であり、これとして、配列番号 1、2、11、25、27、29、30、31、32、63、65、101 および 102 のいずれかと 60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95% またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドまたはその末端切断型が挙げられる。本明細書において提供される部分脱グリコシル化ヒアルロニダーゼはまた、ハイブリッド、融合およびキメラ部分脱グリコシル化ヒアルロニダーゼ、ならびに部分脱グリコシル化ヒアルロニダーゼコンジュゲートを含む。

【0225】

グリコシダーゼまたはグリコシドヒドロラーゼは、グリコシド結合の加水分解を触媒して 2 つの小さな糖を生成する酵素である。脊椎動物における N-グリカンの主要な種類として、高マンノースグリカン、ハイブリッドグリカンおよび複合グリカンが挙げられる。高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを切断する E n d o F 1；二分岐複合体型グリカンを切断する E n d o F 2；二分岐およびより分岐した複合グリカンを切断する E n d o F 3；および高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを切断する E n d o H をはじめ、部分タンパク質脱グリコシル化しかもたらないいくつかのグリコシダーゼがある。可溶性 PH 20 などの可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の、これらのグリコシダーゼの 1 種またはすべてでの処理は、部分脱グリコシル化のみもたらし、従って、ヒアルロニダーゼ活性の保持をもたらし得る。

【0226】

部分脱グリコシル化可溶性ヒアルロニダーゼなど、部分脱グリコシル化ヒアルロナン分解酵素は、1 種または複数のグリコシダーゼ、通常、すべての N-グリカン除去せずに、タンパク質を部分的に脱グリコシル化するだけであるグリコシダーゼでの消化によって製造できる。例えば、PH 20（例えば、組換え PH 20 である指定された r H u P H 20）の、上記のグリコシダーゼの 1 種またはすべて（例えば、E n d o F 1、E n d o F 2 および／または E n d o F 3）での処理は、部分脱グリコシル化をもたらし。これらの部分脱グリコシル化 PH 20 ポリペプチドは、完全グリコシル化ポリペプチドに匹敵するヒアルロニダーゼ酵素活性を示し得る。対照的に、PH 20 の、P N G a s e F というすべての N-グリカンを切断するグリコシダーゼでの処理は、すべての N-グリカンの完全除去をもたらし、それによって、PH 20 を酵素的に不活性にする。したがって、すべての N 結合型グリコシル化部位（例えば、配列番号 1 に例示されるヒト PH 20 のアミノ酸 N 8 2、N 1 6 6、N 2 3 5、N 2 5 4、N 3 6 8 および N 3 9 3 のものなど）がグリコシル化され得るが、1 種または複数のグリコシダーゼでの処理は、1 種または複数のグリコ

シダーゼで消化されていないヒアルロニダーゼと比較してグリコシル化度を低減させ得る。

【0227】

部分脱グリコシル化された可溶性PH20ポリペプチドをはじめとする部分脱グリコシル化ヒアルロナン分解酵素は、完全グリコシル化ポリペプチドのグリコシル化のレベルの10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%を有し得る。一般に、部分脱グリコシル化可溶性PH20ポリペプチドをはじめとする部分脱グリコシル化ヒアルロナン分解酵素は、完全グリコシル化ポリペプチドによって示されるヒアルロニダーゼ活性の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、300%、400%、500%、1000%またはそれ以上であるヒアルロニダーゼ活性を示す。

10

【0228】

5. 修飾された（ポリマーがコンジュゲートした）ヒアルロナン分解酵素

一例では、提供される組成物および組合せは、通常、対象においてヒアルロナン分解酵素の半減期を増大するよう、例えば、延長された／持続された治療効果を促進するよう1個または複数ポリマー分子（ポリマー）とのコンジュゲーションによって修飾されている、ヒアルロナン分解酵素、特に、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する。

【0229】

ポリエチレングリコール（ペグ化部分（PEG））などのポリマー分子の、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素との共有結合またはその他の安定な結合（コンジュゲーション）は、得られるヒアルロナン分解酵素－ポリマー組成物に有益な特性を付与する。このような特性として、生体適合性の改善、血液、細胞における、および／または、対象内のその他の組織におけるタンパク質（および酵素活性）半減期の延長、プロテアーゼおよび加水分解からのタンパク質の有効な遮断、体内分布の改善、薬物動態および／または薬動力学の増強、ならびに水溶性の増大が挙げられる。

20

【0230】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素にコンジュゲートされ得る例示的ポリマーとして、天然および合成ホモポリマー、例えば、ポリオール（すなわち、ポリ－OH）、ポリアミン（すなわち、ポリ－NH₂）およびポリカルボン酸（すなわち、ポリ－COOH）、ならびにさらなるヘテロポリマー、すなわち、1種または複数の異なるカップリング基、例えば、ヒドロキシル基およびアミン基を含むポリマーが挙げられる。適したポリマー分子の例として、ポリプロピレングリコール（PEG）、メトキシポリエチレングリコール（mPEG）およびポリプロピレングリコールをはじめとするポリアルキレングリコール（PAG）などのポリアルキレンオキシド（PAO）、PEG－グリシジルエーテル（Epoxy-PEG）、PEG－オキシカルボニルイミダゾール（CDI-PEG）分岐ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリ－D，L－アミノ酸、ポリエチレン－コマーレイン酸無水物、ポリスチレン－コマーレイン酸無水物、カルボキシメチル－デキストランをはじめとするデキストラン、ヘパリン、相同アルブミン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロースをはじめとするセルロース、キトサンの加水分解産物、ヒドロキシエチルデンプンおよびヒドロキシプロピルデンプンなどのデンプン、グリコーゲン、アガロースおよびその誘導体、グアーガム、プルラン、イヌリン、キサンタンガム、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸加水分解産物およびバイオポリマーの中から選択されるポリマー分子が挙げられる。

30

40

【0231】

通常、ポリマーは、デキストランおよびプルランなどの多糖と比較して、架橋できる反応性基をほとんど有さない、PEG、通常、mPEGなどのポリエチレンオキシドなどのポリアルキレンオキシド（PAO）である。通常、ポリマーは、比較的簡単な化学を使用

50

して、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素に（例えば、タンパク質表面上の結合基に）共有結合によってコンジュゲートできる、（m）ポリエチレングリコール（m PEG）などの非毒性ポリマー分子である。

【0232】

治療薬のペグ化は、タンパク質分解に対する抵抗性を増大し、血漿半減期を増大し、抗原性および免疫原性を低減させると報告されている。ペグ化法の例は、当技術分野で公知である（例えば、Lu and Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu and Felix, *Peptide Res.*, 6: 142-6, 1993; Felix et al., *Int. J. Peptide Res.*, 46: 253-64, 1995; Benhar et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 13398-404, 1994; Brumeanu et al., *J Immunol.*, 154: 3088-95, 1995参照; Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77およびMolineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8Sも参照）。ペグ化はまた、*in vivo*で核酸分子のデリバリーにおいて使用できる。例えば、アデノウイルスのペグ化は、安定性および遺伝子導入を増大し得る（例えば、Cheng et al. (2003) *Pharm. Res.* 20(9): 1444-51参照）。

【0233】

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素との結合のための適したポリマー分子として、それだけには限らないが、ポリエチレングリコール（PEG）およびメトキシポリエチレングリコール（mPEG）、PEG-グリシジルエーテル（Epo-PEG）、PEG-オキシカルボニルイミダゾール（CDI-PEG）、分岐PEGおよびポリエチレンオキシド（PEO）などのPEG誘導体が挙げられる（例えば Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris and Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene Glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar et al., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, *Nature Reviews* 2:215 et seq. (2003);およびTsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004参照）。ポリマー分子は、通常、約3 kDa～約60 kDaの範囲の分子量のものであり得る。いくつかの実施形態では、rHuPH20などのタンパク質にコンジュゲートされるポリマー分子は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60または60 kDaを超える分子量を有する。

【0234】

a. PEG化可溶性ヒアルロナン分解酵素

本明細書における方法、組成物および組合せにおいて使用されるヒアルロナン分解酵素は、PEG化可溶性ヒアルロナン分解酵素などのPEG化ヒアルロナン分解酵素であり得る。一例では、PEG化可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、PEG化rHuPH20である。PEGまたはPEG誘導体を共有結合すること（コンジュゲートすること）によってポリペプチドを修飾する（すなわち「ペグ化」）種々の方法は、当技術分野で公知である（例えば、U. S. 2006/0104968; U. S. 5,672,662; U. S. 6,737,505;およびU. S. 2004/0235734参照）。ペグ化のための技術として、それだけには限らないが、特殊化されたリンカーおよびカップリング化学（例えば、Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002参照）、単一コンジュゲーション部位との複数のPEG部分の結合（分岐PEGの使用などによる;例えば、Veronese et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002参照）、部位特異的ペグ化および/またはモノペグ化（例えば、Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999参照）および部位特異的酵素的ペグ化（例えば、Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002参照）が挙げられる。当技術分野で記載される方法および技術は、単一タンパク質分子に結合される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10を超えるPEGまたはPEG誘導体を有するタンパク質を製造できる（例えば、U. S. 2006/0104968参照）。

【0235】

当技術分野では、ペグ化のための多数の試薬が記載されている。このような試薬として、それだけには限らないが、N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）活性化PEG、

スクシンイミジルmPEG、mPEG₂-N-ヒドロキシスクシンイミド、mPEGスクシンイミジルα-メチルブタノエート、mPEGスクシンイミジルプロピオネート、mPEGスクシンイミジルブタノエート、mPEGカルボキシメチル3-ヒドロキシブタン酸スクシンイミジレステル、ホモ二官能性PEG-スクシンイミジルプロピオネート、ホモ二官能性PEGプロピオンアルデヒド、ホモ二官能性PEGブチルアルデヒド、PEGマレイミド、PEGヒドラジン、p-ニトロフェニルカルボネートPEG、mPEG-ベンゾトリアゾールカルボネート、プロピオンアルデヒドPEG、mPEGブトリアルデヒド(butyraldehyde)、分岐mPEG₂ブチルアルデヒド、mPEGアセチル、mPEGピペリドン、mPEGメチルケトン、mPEG「リンカーなし」マレイミド、mPEGビニルスルホン、mPEGチオール、mPEGオルトピリジルチオエステル、mPEGオルトピリジルジスルフィド、Fmoc-PEG-NHS、Boc-PEG-NHS、ビニルスルホンPEG-NHS、アクリレートPEG-NHS、フルオレセインPEG-NHSおよびビオチンPEG-NHSが挙げられる(例えば、Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69、1995; Veronese et al., J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207、1997; U. S. 5, 672, 662; U. S. 5, 932, 462; U. S. 6, 495, 659; U. S. 6, 737, 505; U. S. 4, 002, 531; U. S. 4, 179, 337; U. S. 5, 122, 614; U. S. 5, 183, 550; U. S. 5, 324, 844; U. S. 5, 446, 090; U. S. 5, 612, 460; U. S. 5, 643, 575; U. S. 5, 766, 581; U. S. 5, 795, 569; U. S. 5, 808, 096; U. S. 5, 900, 461; U. S. 5, 919, 455; U. S. 5, 985, 263; U. S. 5, 990, 237; U. S. 6, 113, 906; U. S. 6, 214, 966; U. S. 6, 258, 351; U. S. 6, 340, 742; U. S. 6, 413, 507; U. S. 6, 420, 339; U. S. 6, 437, 025; U. S. 6, 448, 369; U. S. 6, 461, 802; U. S. 6, 828, 401; U. S. 6, 858, 736; U. S. 2001/0021763; U. S. 2001/0044526; U. S. 2001/0046481; U. S. 2002/0052430; U. S. 2002/0072573; U. S. 2002/0156047; U. S. 2003/0114647; U. S. 2003/0143596; U. S. 2003/0158333; U. S. 2003/0220447; U. S. 2004/0013637; US2004/0235734; U. S. 2005/000360; U. S. 2005/0114037; U. S. 2005/0171328; U. S. 2005/0209416; EP01064951; EP0822199; WO00176640; WO0002017; WO0249673; WO9428024; およびWO0187925参照)。

【0236】

D. ヒアルロナン分解酵素をコードする核酸およびそのポリペプチドを製造する方法

本明細書に示される可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素のポリペプチドは、タンパク質精製および組換えタンパク質発現のための当技術分野で周知の方法によって得ることができる。所望の遺伝子をコードする核酸の同定のための当業者に公知の任意の方法を使用できる。当技術分野で利用可能な任意の方法を使用して、細胞または組織供給源などから、ヒアルロニダーゼをコードする、全長(すなわち、全コード領域を包含する)cDNAまたはゲノムDNAクローンを得ることができる。修飾された、または変異体の可溶性ヒアルロニダーゼは、位置特異的突然変異誘発などによって、野生型ポリペプチドから操作することができる。

【0237】

ポリペプチドは、核酸分子をクローニングおよび単離するための当技術分野で公知の任意の利用可能な方法を使用してクローニングまたは単離できる。このような方法として、核酸のPCR増幅ならびに核酸ハイブリダイゼーションスクリーニング、抗体ベースのスクリーニングおよび活性ベースのスクリーニングをはじめとするライブラリーのスクリーニングが挙げられる。

【0238】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法をはじめとする核酸を増幅する方法を使用して、所望のポリペプチドをコードする核酸分子を単離できる。核酸を含有する物質を、所望のポリペプチドをコードする核酸分子が単離され得る出発物質として使用してもよい。増幅方法では、例えば、DNAおよびmRNA調製物、細胞抽出物、組織抽出物、流体サンプル（例えば、血液、血清、唾液）、健常および／または病気の対象由来のサンプルを使用できる。核酸ライブラリーはまた、出発物質の供給源としても使用できる。プライマーは、所望のポリペプチドを増幅するよう設計できる。例えば、プライマーは、所望のポリペプチドが生成する発現される配列に基づいて設計できる。プライマーは、ポリペプチドアミノ酸配列の逆翻訳に基づいて設計できる。増幅によって生じた核酸分子を配列決定し、所望のポリペプチドをコードすると確認することができる。

10

【0239】

合成遺伝子をベクター、例えば、タンパク質発現ベクターまたはコアタンパク質コーディングDNA配列の増幅のために設計されたベクターにクローニングすることを目的として、ポリペプチドをコードする核酸分子に、制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するリンカー配列をはじめとするさらなる核酸配列を結合してもよい。さらに、機能的DNAエレメントを規定するさらなる核酸配列を、ポリペプチドをコードする核酸分子と作用可能に連結してもよい。このような配列の例として、それだけには限らないが、細胞内タンパク質発現を促進するよう設計されたプロモーター配列、およびタンパク質分泌を促進するよう設計された分泌配列、例えば、異種シグナル配列が挙げられる。このような配列は、当業者には公知である。タンパク質結合領域を規定する塩基の配列などのさらなるヌクレオチド残基配列も、酵素をコードする核酸分子に連結してもよい。このような領域として、それだけには限らないが、酵素の特定の標的細胞への取り込みを促進する、あるいは、合成遺伝子の生成物の薬物動態を変更するタンパク質を促進またはコードする残基の配列が挙げられる。例えば、酵素をPEG部分に連結してもよい。

20

【0240】

例えば、ポリペプチドの検出またはアフィニティー精製において役立つよう、さらに、タグまたはその他の部分を加えてもよい。例えば、エピトープタグまたはその他の検出可能なマーカーを規定する塩基の配列などのさらなるヌクレオチド残基配列も、酵素をコードする核酸分子に連結できる。このような配列の例示的なものとして、Hisタグ（例えば、6xHis、HHHHHH；配列番号54）またはFlagタグ（DYKDDDDK；配列番号55）をコードする核酸配列が挙げられる。

30

【0241】

次いで、同定および単離された核酸を、適当なクローニングベクターに挿入できる。当技術分野で公知の多数のベクター-宿主系を使用できる。可能性のあるベクターとして、それだけには限らないが、プラスミドまたは修飾されたウイルスが挙げられるが、ベクター系は、使用される宿主細胞と適合しなければならない。このようなベクターとして、それだけには限らないが、λ誘導体などのバクテリオファージまたはpCMV4、pBR322もしくはpUCプラスミド誘導体などのプラスミドまたはBlueScriptベクター（Stratagene, La Jolla, CA）が挙げられる。その他の発現ベクターとして、本明細書に例示されるHZ24発現ベクターが挙げられる。クローニングベクターへの挿入は、例えば、DNA断片を、相補的な付着末端を有するクローニングベクター中にライゲーションすることによって達成できる。挿入は、TOPOクローニングベクター（INVITROGEN, Carlsbad, CA）を使用して達成できる。DNAを断片化するために使用された相補的制限部位が、クローニングベクター中に存在しない場合には、DNA分子の末端を酵素的に修飾できる。あるいは、DNA末端にヌクレオチド（リンカー）配列をライゲーションすることによって望まれる任意の部位を製造してもよく；これらのライゲーションされるリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学合成されたオリゴヌクレオチドを含有し得る。代替法では、切断されたベクターおよびタンパク質遺伝子を、ホモポリマーテリングによって

40

50

修飾できる。組換え分子は、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションおよびソノポレーションによって宿主細胞に導入でき、その結果、遺伝子配列の多数のコピーが作製される。

【0242】

特定の実施形態では、単離されたタンパク質遺伝子、cDNAまたは合成DNA配列を組み込む、宿主細胞の組換えDNA分子を用いる形質転換によって、遺伝子のマルチプルコピーの作製が可能となる。したがって、形質転換体を増殖させること、形質転換体から組換えDNA分子を単離することおよび必要に応じて、単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することによって遺伝子を多量に得ることができる。

【0243】

1. ベクターおよび細胞

本明細書に記載されるいずれかなどの所望のタンパク質の1種または複数の組換え発現のために、タンパク質をコードするヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含有する核酸を、適当な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳のための必要なエレメントを含有するベクターに挿入できる。必要な転写および翻訳シグナルはまた、酵素遺伝子の天然プロモーターおよび／またはそのそれぞれの両端に位置する領域によっても供給され得る。

【0244】

また、酵素をコードする核酸を含有するベクターも提供される。ベクターを含有する細胞も提供される。細胞は、真核細胞および原核細胞を含み、ベクターは、それにおいて使用するための任意の適したものである。

【0245】

ベクターを含有する、内皮細胞をはじめとする原核細胞および真核細胞が提供される。このような細胞として、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、古細菌、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が挙げられる。細胞は、コードされるタンパク質が細胞によって発現される条件下で上記の細胞を増殖させることおよび発現されたタンパク質を回収することによってそのタンパク質を産生するよう使用される。本明細書における目的上、例えば、酵素は、培地中に分泌され得る。

【0246】

天然または異種シグナル配列と結合している、ヒアルロナン分解酵素ポリペプチド、いくつかの例では、可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列、ならびにそのマルチプルコピーを含有するベクターが提供される。ベクターは、細胞における酵素タンパク質の発現が得られるように、または酵素タンパク質が分泌タンパク質として発現されるように選択され得る。

【0247】

タンパク質コード配列を発現するために種々の宿主-ベクター系を使用できる。これらとして、それだけには限らないが、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスおよびその他のウイルス）に感染した哺乳類細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；酵母ベクターを含有する酵母などの微生物；またはバクテリオファージで形質転換された細菌、DNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAが挙げられる。ベクターの発現エレメントは、その強度および特異性が異なる。使用される宿主-ベクター系に応じて、いくつかの適した転写および翻訳エレメントのうち任意の1種を使用できる。

【0248】

適当な転写／翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列を含有するキメラ遺伝子を含有する発現ベクターを構築するために、DNA断片をベクターに挿入するための当業者に公知の任意の方法を使用できる。これらの方法として、in vitro組換えDNAおよび合成技術およびin vivo組換え（遺伝子組換え）が挙げられる。タンパク質またはそのドメイン、誘導体、断片もしくは相同体をコードする核酸配列の発現は、組換えDNA分子（単数または複数）で形質転換された宿主において遺伝子またはその断片が

10

20

30

40

50

発現されるよう第2の核酸配列によって調節できる。例えば、タンパク質の発現は、当技術分野で公知の任意のプロモーター／エンハンサーによって制御できる。特定の実施形態では、プロモーターは、所望のタンパク質の遺伝子にとって天然ではない。使用できるプロモーターとして、それだけには限らないが、SV40初期プロモーター(Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復配列に含まれるプロモーター(Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982))；β-ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物の発現ベクター(Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543)またはtacプロモーター(DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983));Scientific American 242:79-94 (1980)中の"Useful Proteins from Recombinant Bacteria"も参照)；ノバリンシンセターゼプロモーターを含有する植物発現ベクター(Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984))またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981))および光合成酵素リブローズ二リン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984))；Gal4プロモーターなどの酵母およびその他の真菌に由来するプロモーターエレメント、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターならびに組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されてきた以下の動物転写制御領域：膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift et al., Cell 38:639-646 (1984);Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986);MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987))；膵臓β細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域(Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985))、リンパ球細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., Cell, 38:647-658 (1984);Adams et al., Nature 318:533-538 (1985));Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987))、精巣、乳房、リンパ系および肥満細胞において活性であるマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域(Leder et al., Cell 45:485-495 (1986))、肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域(Pinckert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987))、肝臓において活性であるαフェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985);Hammer et al., Science 235:53-58 (1987))、肝臓において活性であるα-1アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987))、骨髄系細胞において活性であるβグロビン遺伝子制御領域(Magram et al., Nature 315:338-340 (1985);Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986))、脳の乏突起神経膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク遺伝子制御領域(Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987))、骨格筋において活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Shani, Nature 314:283-286 (1985))および視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞において活性であるゴナドトロフィン放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986))が挙げられる。

【0249】

特定の実施形態では、所望のタンパク質またはそのドメイン、断片、誘導体または相同体をコードする核酸、1つまたは複数の複製起点、および所望により、1種または複数の選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）と作用可能に連結しているプロモーターを含有するベクターが使用される。大腸菌(E. coli)細胞の形質転換のための例示的プラスミドベクターとして、例えば、pQE発現ベクター(Qiagen, Valencia, CAから入手可能；Qiagenによって公開された、このシステムを説明する文献も参照)が挙げられる。pQEベクターは、ファージT5プロモーター（大腸菌RNAポリメラーゼによって認識される）および厳重に調節された、大腸菌における組換えタンパク質の高レベル発現を提供するための二重lacオペレーター抑制モジュール、効率的な翻訳のための合成リボソーム結合部位(RBS II)、6XHisタグコード配列、t₀およびT1転写ターミネーター、ColE1複製起点およびアンピシリン耐性を付与

するためのβ-ラクタマーゼ遺伝子を有する。pQEベクターは、6xHisタグを組換えタンパク質のN-またはC末端のいずれかに配置することができる。このようなプラスミドとして、3種のリーディングフレームすべての多重クローニング部位を提供し、N末端に6xHisタグのついたタンパク質の発現を提供する、pQE32、pQE30およびpQE31が挙げられる。大腸菌細胞の形質転換のためのその他の例示的プラスミドベクターとして、例えば、pET発現ベクター（米国特許第4,952,496号；NOVAGEN、Madison、WIから入手可能；Novagenによって公開され、このシステムを説明する文献も参照）が挙げられる。このようなプラスミドとして、T7lacプロモーター、T7ターミネーター、誘導可能な大腸菌lacオペレーターおよびlacレプレッサー遺伝子を含むpET11a；T7プロモーター、T7ターミネーターおよび大腸菌ompT分泌シグナルを含むpET12a-c；ならびにHisカラムを用いる精製において使用するためのHis-Tag（商標）リーダー配列およびカラムを通した精製後の切断を可能にするトロニン切断部位、T7-lacプロモーター領域およびT7ターミネーターを含むpET15bおよびpET19b（NOVAGEN、Madison、WI）が挙げられる。

10

【0250】

哺乳類細胞発現のためのベクターの例示的なものとして、HZ24発現ベクターがある。HZ24発現ベクターは、pCIベクター骨格（Promega）から導いた。それは、β-ラクタマーゼ耐性遺伝子（Amp^R）、F1複製起点、サイトメガロウイルス初期エンハンサー／プロモーター領域（CMV）およびSV40後期ポリ阿德ニル化シグナル（SV40）をコードするDNAを含む。発現ベクターはまた、ECMVウイルス（Clontech）由来の配列内リボソーム進入部位（IRES）およびマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子も有する。

20

【0251】

2. 発現

可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドをはじめとするヒアルロナン分解酵素ポリペプチドは、*in vivo*および*in vitro*法を含めた当業者に公知の任意の方法によって製造できる。所望のタンパク質は、例えば、投与および治療に必要とされるなど、必要である量および形態のタンパク質を産生するのに適した任意の生物において発現させることができる。発現宿主として、大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞株およびトランスジェニック動物を含めた哺乳類細胞などの原核生物および真核生物が挙げられる。発現宿主は、そのタンパク質製造レベルならびに発現されるタンパク質に存在する翻訳後修飾の種類において異なり得る。発現宿主の選択は、これらならびに調節性および安全性の検討事項、製造コストおよび精製に必要なものおよび精製方法などのその他の因子に基づいて行うことができる。

30

【0252】

多数発現ベクターが利用可能であり、当業者に公知であり、タンパク質の発現のために使用できる。発現ベクターの選択は、宿主発現系の選択によって影響を受ける。一般に、発現ベクターは、転写プロモーター、および所望により、エンハンサー、翻訳シグナルならびに転写および翻訳終結シグナル含み得る。安定な形質転換に使用される発現ベクターは、通常、形質転換細胞の選択および維持を可能にする選択マーカーを有する。いくつかの場合には、複製起点をベクターのコピー数を増幅するために使用できる。

40

【0253】

可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドなどのヒアルロナン分解酵素ポリペプチドを、タンパク質融合物として利用または発現させることができる。例えば、酵素にさらなる機能性を付加するために酵素融合物を作製できる。酵素融合タンパク質の例として、それだけには限らないが、シグナル配列、局在のためなどのタグ、例えば、his₆タグもしくはmycタグ、または精製のためのタグ、例えば、GST融合物、およびタンパク質分泌および／または膜結合に向かわせる配列の融合物が挙げられる。

【0254】

50

a. 原核細胞

原核生物、特に、大腸菌は、多量のタンパク質を産生する系を提供する。大腸菌の形質転換は、当業者に周知の簡単で迅速な技術である。大腸菌の発現ベクターは、誘導プロモーターを含有し得、このようなプロモーターは、高レベルのタンパク質発現を誘導するのに、また宿主細胞にとって幾分か毒性を示すタンパク質を発現するのに有用である。誘導プロモーターの例として、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、ハイブリッド *tac*プロモーター、T7およびSP6 RNAプロモーターおよび温度調節 *λ* PLプロモーターが挙げられる。

【0255】

本明細書において提供されるいずれかのものなどのタンパク質は、大腸菌の細胞質環境中に発現させることができる。細胞質は、還元性環境であり、一部の分子にとっては、これが、不溶性封入体の形成をもたらし得る。ジチオトレイトールおよびβ-メルカプトエタノールなどの還元剤およびグアニジン-HClおよび尿素などの変性剤を使用して、このようなタンパク質を再可溶化できる。代替アプローチは、酸化環境およびシャペロニン様およびジスルフィドイソメラーゼを提供し、可溶性タンパク質の産生をもたらし得る細菌の細胞膜周辺腔におけるタンパク質の発現である。通常、リーダー配列が、発現されるタンパク質に融合され、これがタンパク質を周辺質に向ける。次いで、リーダーは、周辺質の内側のシグナルペプチダーゼによって除去される。細胞膜周辺にターゲティングするリーダー配列の例として、ペクチン酸リアーゼ遺伝子由来の *pelB* リーダーおよびアルカリホスファターゼ遺伝子由来のリーダーが挙げられる。いくつかの場合には、細胞膜周辺の発現によって、発現されたタンパク質の培養培地中への漏出が可能となる。タンパク質の分泌によって、培養上清からの迅速で、簡単な精製が可能となる。分泌されないタンパク質は、浸透圧溶解によって周辺質から得ることができる。いくつかの場合には、細胞質発現と同様に、タンパク質が不溶性となる場合があり、変性剤および還元剤を使用して可溶化および再フォールディングを促進できる。誘導および増殖の温度も、発現レベルおよび溶解度に影響を及ぼす場合があり、一般に、25℃から37℃の間の温度が使用される。通常、細菌は、グリコシル化されたタンパク質を産生する。したがって、タンパク質が機能のためにグリコシル化を必要とする場合、宿主細胞から精製した後にグリコシル化を *in vitro* で加えることができる。

【0256】

b. 酵母細胞

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母は、本明細書に記載されるいずれかのものなどのタンパク質の製造に使用できる周知の酵母発現宿主である。酵母は、エピソーム複製ベクターを用いてまたは相同組換えによる安定な染色体組込みによって形質転換できる。通常、誘導プロモーターを使用して、遺伝子発現を調節する。このようなプロモーターの例として、*GAL1*、*GAL7* および *GAL5* ならびに *CUP1*、*AOX1* などのメタロチオネインプロモーターまたはその他のピチア (*Pichia*) またはその他の酵母プロモーターが挙げられる。発現ベクターは、形質転換DNAの選択および維持のために、*LEU2*、*TRP1*、*HIS3* および *URA3* などの選択マーカーを含むことが多い。酵母において発現されるタンパク質は、可溶性であることが多い。*Bip* などのシャペロニンおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼの同時発現によって、発現レベルおよび溶解度を改善できる。さらに、酵母において発現されるタンパク質は、サッカロミセス・セレビシエ由来の酵母接合型α因子分泌シグナルなどの分泌シグナルペプチド融合物および *Agap* 接合接着受容体またはアークスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*) グルコアミラーゼなどの酵母細胞表面タンパク質との融合物を使用して分泌に向けることができる。*Kex-2* プロテアーゼなどのプロテアーゼ切断部位を操作して、

それらが分泌経路から出る時に発現されたポリペプチドから融合している配列を除去できる。酵母はまた、A s n - X - S e r / T h r モチーフでグリコシル化できる。

【0257】

c. 昆虫細胞

特に、バキュロウイルス発現を使用する昆虫細胞は、ヒアルロニダーゼポリペプチドなどのポリペプチドを発現するのに有用である。昆虫細胞は、高レベルのタンパク質を発現し、高等真核生物によって使用される翻訳後修飾のほとんどが可能である。バキュロウイルスは、安全性を改善し、真核細胞の発現の調節上の懸念を低減する限定的宿主域を有する。通常の発現ベクターは、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターなどの高レベル発現のためのプロモーターを使用する。よく使用されるバキュロウイルス系として、オートグラフィア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (*AcNPV*) およびカイコ (*Bombyx mori*) 核多角体病ウイルス (*BmNPV*) などのバキュロウイルス、ならびにスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*)、シューダレチア・ユニプンクタ (*Pseudaletia unipuncta*) (A7S) およびダナウス・プレクシプス (*Danaus plexippus*) (DpN1) 由来の Sf9 などの昆虫細胞株が挙げられる。高レベル発現のために、発現される分子のヌクレオチド配列を、ウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合する。哺乳類分泌シグナルは、昆虫細胞において正確にプロセッシングされ、これを使用して発現されるタンパク質を培養培地中に分泌できる。さらに、細胞株シューダレチア・ユニプンクタ (A7S) およびダナウス・プレクシプス (DpN1) は、哺乳類細胞系と同様のグリコシル化パターンを有するタンパク質を産生する。

【0258】

昆虫細胞における代替発現系は、安定に形質転換された細胞の使用である。Schneider 2 (S2) および Kc 細胞 (キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)) および C7 細胞 (ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)) などの細胞株を、発現のために使用できる。ドロソフィラ (*Drosophila*) メタロチオネインプロモーターを使用して、カドミウムまたは銅を用いる重金属誘導の存在下で高レベルの発現を誘導できる。発現ベクターは、通常、ネオマイシンおよびハイグロマイシンなどの選択マーカーの使用によって維持される。

【0259】

d. 哺乳類細胞

哺乳類発現系を使用して、可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドなどのヒアルロナン分解酵素ポリペプチドをはじめとするタンパク質を発現できる。発現構築物を、アデノウイルスなどのウイルス感染によって、またはリポソーム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランなどの直接 DNA 導入によって、およびエレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションなどの物理的手段によって哺乳類細胞に導入することができる。哺乳類細胞のための発現ベクターは、通常、mRNA キャップ部位、TATA ボックス、翻訳開始配列 (Kozak コンセンサス配列) およびポリアデニル化エレメントを含む。また、IRES エレメントを加えて、選択マーカーなどの別の遺伝子を用いてバイシストロニック発現を可能にすることができる。このようなベクターは、高レベル発現のための転写プロモーター-エンハンサー、例えば、SV40 プロモーター-エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス (RSV) の長い末端反復配列を含むことが多い。これらのプロモーター-エンハンサーは、多数の細胞種において活性である。組織および細胞種プロモーターおよびエンハンサー領域もまた、発現のために使用できる。例示的プロモーター/エンハンサー領域として、それだけには限らないが、エラスターゼ I、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳房腫瘍ウイルス、アルブミン、 α フェトプロテイン、 α 1 アンチトリプシン、 β グロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖 2 および性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御などの遺伝子に由来するものが挙げられる。選択マーカーを使用して、発現構築物を含む細胞を選択および維持す

ることができる。選択マーカー遺伝子の例として、それだけには限らないが、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。例えば、発現は、DHFR遺伝子を発現する細胞のみを選択するようメトトレキサートの存在下で実施できる。TCR- ζ およびFc ϵ RI- γ などの細胞表面シグナル伝達分子との融合物は、活性な状態のタンパク質の発現を細胞表面に向けることができる。

【0260】

マウス、ラットヒト、サル、ニワトリおよびハムスター細胞をはじめとする多数の細胞株が哺乳類発現に利用可能である。例示的細胞株として、それだけには限らないが、CHO、Balb/3T3、HeLa、MT2、マウスNS0（非分泌性）およびその他の骨髓腫細胞株、ハイブリドーマおよびヘテロハイブリドーマ細胞株、リンパ球、線維芽細胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、293S、2B8およびHKB細胞が挙げられる。細胞培養培地からの分泌されたタンパク質の精製を容易にする血清不含培地に適応している細胞株も利用可能である。例として、CHO-S細胞（Invitrogen、Carlsbad、CA、カタログ番号11619-012）および血清不含EBNA-1細胞株(Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.)が挙げられる。最大発現のために最適化された特定の培地で増殖するよう適応している細胞株も利用可能である。例えば、DG44 CHO細胞は、化学的に定義された動物産物を含まない培地で懸濁培養において増殖するよう適応している。

【0261】

e. 植物

トランスジェニック植物細胞および植物を使用して、本明細書に記載されるいずれかのものなどのタンパク質を発現できる。発現構築物は、通常、微粒子銃およびプロトプラストへのPEG媒介性導入などの直接DNA導入を使用して、またアグロバクテリウム媒介性形質転換を用いて植物に導入される。発現ベクターは、プロモーターおよびエンハンサー配列、転写終結エレメントおよび翻訳制御エレメントを含み得る。発現ベクターおよび形質転換技術は、通常、シロイヌナズナおよびタバコなどの双子葉植物宿主と、トウモロコシおよびイネなどの単子葉植物宿主の間に分けられる。発現のための植物プロモーターの例として、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ノパリンシンセターゼプロモーター、リボスビスホスフェートカルボキシラーゼプロモーターおよびユビキチンおよびUBQ3プロモーターが挙げられる。形質転換細胞の選択および維持を容易にするために、ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの選択マーカーが使用されることが多い。形質転換された植物細胞は、細胞、凝集塊（カルス組織）として培養物で維持でき、または植物全体に再生できる。トランスジェニック植物細胞はまた、ヒアルロニダーゼポリペプチドを産生するよう操作された藻類を含み得る。植物は、哺乳類細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これは、これらの宿主において産生されるタンパク質の選択に影響を及ぼし得る。

【0262】

3. 精製技術

宿主細胞からヒアルロナン分解酵素ポリペプチド（例えば、可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチド）またはその他のタンパク質を含めたポリペプチドを精製する方法は、選択された宿主細胞および発現系に応じて変わる。分泌される分子については、タンパク質は、通常、細胞を回収した後に培養培地から精製される。細胞内発現については、細胞を溶解し、抽出物からタンパク質を精製することができる。トランスジェニック植物および動物などのトランスジェニック生物が発現のために使用される場合には、組織または臓器を出発物質として使用し、溶解した細胞抽出物を製造できる。さらに、トランスジェニック動物製造は、ミルクまたは卵中でのポリペプチドの製造を含み得、ポリペプチドは回収でき、必要に応じて、タンパク質を抽出し、当技術分野における標準方法を使用してさらに精製できる。

【0263】

可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドなどのタンパク質は、それだけには限らないが、SDS-PAGE、サイズ分画およびサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿および陰イオン交換などのイオン交換クロマトグラフィーをはじめとする当技術分野で公知の標準タンパク質精製技術を使用して精製できる。また、アフィニティー精製技術を利用して、調製物の効率および純度を改善できる。例えば、抗体、受容体およびヒアルロニダーゼ酵素と結合するその他の分子を、アフィニティー精製において使用できる。発現構築物はまた、mycエピトープ、GST融合物またはHis₆などの親和性タグをタンパク質に付加するよう操作し、それぞれ、myc抗体、グルタチオン樹脂およびNi樹脂を用いてアフィニティー精製できる。純度は、ゲル電気泳動および染色および分光光度的技術をはじめとする当技術分野で公知の任意の方法によって評価できる。本明細書において提供されるような、精製されたrHuPH20組成物は、通常、実施例2において決定されるような、約120,000ユニット/mgの比活性を有する。

10

【0264】

4. ヒアルロナン分解酵素ポリペプチドのペグ化

ポリエチレングリコール(PEG)は、主に、PEGが生体適合性、非毒性、非免疫原性および水溶性ポリマーであるために、生体材料、バイオテクノロジーおよび医薬において広く使用されてきた(Zhao and Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997)。薬物デリバリーの領域では、PEG誘導体が、免疫原性、タンパク質分解および腎臓クリアランスを低減し、溶解度を高めるためのタンパク質との共有結合(すなわち、「ペグ化」)において広く使用されてきた(Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995)。同様に、PEGは、溶解度を高め、毒性を低減し、体内分布を変更するために、低分子量の、比較的疎水性の薬物と結合されてきた。一般に、PEG化薬物は、溶液として注射される。

20

【0265】

分解可能な、可溶性の薬剤担体の設計において使用されるものと同様の化学のほとんどを、分解可能なゲルの設計においても使用できるので、密接に関連している適用は、薬物デリバリーにおいて使用するための、架橋した分解可能なPEGネットワークまたは処方の合成である(Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993)。また、2種の相補的ポリマーの溶液を混合することによって高分子間錯体が形成され得るということも知られている。このような錯体は、通常、関与するポリマー間の静電的相互作用(ポリアニオン-ポリカチオン)および/もしくは水素結合(ポリ酸-ポリ塩基)によって、ならびに/または水性環境中のポリマー間の疎水性相互作用によって安定化される(Krupers et al., Eur. Polym J. 32:785-790, 1996)。例えば、適切な条件下でポリアクリル酸(PAAc)およびポリエチレンオキシド(PEO)の溶液を混合することは、主に水素結合に基づく錯体の形成をもたらす。生理学的状態でのこれらの錯体の解離は、遊離薬物のデリバリーのために使用されてきた(すなわち、非PEG化)。さらに、相補的ポリマーの錯体は、ホモポリマーおよびコポリマーの両方から形成されてきた。

30

【0266】

ペグ化のための多数の試薬が、当技術分野で記載されている。このような試薬として、それだけには限らないが、N-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)活性化PEG、スクシンイミジルmPEG、mPEG₂-N-ヒドロキシスクシンイミド、mPEGスクシンイミジルα-メチルブタノエート、mPEGスクシンイミジルプロピオネート、mPEGスクシンイミジルブタノエート、mPEGカルボキシメチル3-ヒドロキシブタン酸スクシンイミジルエステル、ホモ二官能性PEG-スクシンイミジルプロピオネート、ホモ二官能性PEGプロピオンアルデヒド、ホモ二官能性PEGブチルアルデヒド、PEGマレイミド、PEGヒドラジン、p-ニトロフェニルカルボネートPEG、mPEG-ベンゾトリアゾールカルボネート、プロピオンアルデヒドPEG、mPEGブトリアルデヒド(butyraldehyde)、分岐mPEG₂ブチルアルデヒド、mPEGアセチル、mPEGピペリドン、mPEGメチルケトン、mPEG「リンカーなし」マレイミド

40

50

、m P E G ビニルスルホン、m P E G チオール、m P E G オルトピリジルチオエステル、m P E G オルトピリジルジスルフィド、F m o c - P E G - N H S、B o c - P E G - N H S、ビニルスルホン P E G - N H S、アクリレート P E G - N H S、フルオレセイン P E G - N H S および ビオチン P E G - N H S が挙げられる（例えば、Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6:62-69, 1995; Veronese et al., J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; U. S. 5, 672, 662; U. S. 5, 932, 462; U. S. 6, 495, 659; U. S. 6, 737, 505; U. S. 4, 002, 531; U. S. 4, 179, 337; U. S. 5, 122, 614; U. S. 5, 183, 550; U. S. 5, 324, 844; U. S. 5, 446, 090; U. S. 5, 612, 460; U. S. 5, 643, 575; U. S. 5, 766, 581; U. S. 5, 795, 569; U. S. 5, 808, 096; U. S. 5, 900, 461; U. S. 5, 919, 455; U. S. 5, 985, 263; U. S. 5, 990, 237; U. S. 6, 113, 906; U. S. 6, 214, 966; U. S. 6, 258, 351; U. S. 6, 340, 742; U. S. 6, 413, 507; U. S. 6, 420, 339; U. S. 6, 437, 025; U. S. 6, 448, 369; U. S. 6, 461, 802; U. S. 6, 828, 401; U. S. 6, 858, 736; U. S. 2001/0021763; U. S. 2001/0044526; U. S. 2001/0046481; U. S. 2002/0052430; U. S. 2002/0072573; U. S. 2002/0156047; U. S. 2003/0114647; U. S. 2003/0143596; U. S. 2003/0158333; U. S. 2003/0220447; U. S. 2004/0013637; U. S. 2004/0235734; U. S. 2005/000360; U. S. 2005/0114037; U. S. 2005/0171328; U. S. 2005/0209416; E P 01064951; E P 0822199; W O 00176640; W O 0002017; W O 0249673; W O 9428024; および W O 0187925 参照）。

【0267】

一例では、ポリエチレングリコールは、約 3 k D から約 50 k D、好ましくは、約 5 k D から約 30 k D の範囲の分子量を有する。P E G の薬物との共有結合（「ペグ化」として知られる）は、公知の化学合成技術によって達成できる。例えば、タンパク質のペグ化は、適した反応条件下で N H S 活性化 P E G を、タンパク質と反応させることによって達成できる。

【0268】

ペグ化について多数の反応が記載されているが、最も一般的に適用可能なものは、方向性を付与し、穏やかな反応条件を利用し、毒性触媒または副生成物（b i p r o d u c t）を除去するための大規模な下流処理を必要としない。例えば、モノメトキシ P E G（m P E G）は、1 個の反応性末端ヒドロキシルしか有さず、したがって、その使用によって、得られる P E G - タンパク質生成物混合物の不均一性の一部が制限される。通常、末端メトキシ基の反対側のポリマーの末端のヒドロキシル基の活性化が、誘導体化 P E G を求核攻撃に対してより感受性にするを目的とした効率的なタンパク質ペグ化を達成するために必要である。攻撃性求核試薬は、通常、リシル残基の ϵ - アミノ基であるが、局所条件が好都合である場合には、その他のアミンも反応し得る（例えば、N 末端 α - アミンまたはヒスチジンの環アミン）。単一のリシンまたはシステインを含有するタンパク質では、より指向性のある結合が起こり得る。後者の残基は、チオール特異的修飾のために P E G - マレイミドによって標的とされ得る。あるいは、P E G ヒドラジンを、過ヨウ素酸酸化されたヒアルロナン分解酵素と反応させ、N a C N B H ₃ の存在下で還元することができる。より詳しくは、P E G 化 C M P 糖を、適当なグリコシルトランスフェラーゼの存在下でヒアルロナン分解酵素と反応させることができる。1 つの技術として、いくつかのポリマー分子が、問題のポリペプチドとカップリングされる「ペグ化」技術がある。この技術を使用する場合には、免疫系が、抗体の形成に参与するポリペプチドの表面上のエピトープを認識することが困難になり、それによって、免疫応答が低減する。特定の生理

学的効果を与えるようヒト身体の循環系に直接導入されるポリペプチド（すなわち、医薬品）については、通常の可能性ある免疫応答は、I g Gおよび／またはI g M応答であるが、呼吸器系によって吸入されるポリペプチド（すなわち、工業用ポリペプチド）は、I g E 応答（すなわち、アレルギー反応）を潜在的に引き起こし得る。免疫応答の低減を説明する理論の1つは、ポリマー分子（単数または複数）が、抗体形成につながる免疫応答に關与するポリペプチドの表面上にあるエピトープ（単数または複数）を遮蔽するということである。別の理論または少なくとも部分的な要因は、コンジュゲートが重いほど、より低減された免疫応答が得られるということである。

【0269】

通常、PEG化ヒアルロニダーゼをはじめとする本明細書において提供されるPEG化ヒアルロナン分解酵素を製造するには、PEG部分を共有結合によってポリペプチドにコンジュゲートさせる。ペグ化のための技術として、それだけには限らないが、特殊化されたリンカーおよびカップリング化学（例えば、Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002）、単一コンジュゲーション部位との複数のPEG部分の結合（分岐PEGの使用などによる；例えば、Veronese et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002 参照）、部位特異的ペグ化および／またはモノペグ化（例えば、Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999参照）および部位特異的酵素的ペグ化（例えば、Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002参照）が挙げられる。当技術分野で記載されている方法および技術によって、単一のタンパク質分子と結合している1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10を超えるPEGまたはPEG誘導体を有するタンパク質を製造できる（例えば、U. S. 2006/0104968 参照）。 10 20

【0270】

PEG化ヒアルロニダーゼなどのPEG化ヒアルロナン分解酵素を製造するための例示的方法のペグ化の例示的例として、PEG部分、通常、スクシンイミジルPEGをrHuPH20とコンジュゲートするために、PEGアルデヒド、スクシンイミドおよびカルボネートが各々適用されている。例えば、rHuPH20は、mPEG-スクシンイミジルプロピオネート（mPEG-SPA）、mPEG-スクシンイミジルブタノエート（mPEG-SBA）および（「分岐」PEGを結合するための）mPEG2-N-ヒドロキシルスクシンイミドをはじめとする例示的スクシンイミジルモノPEG（mPEG）試薬を用いてコンジュゲートされている。これらのPEG化スクシンイミジルエステルは、PEG基および活性化されたクロスリンカー、および単一または分岐PEG基のいずれかの間に種々の長さの炭素骨格を含有する。これらの相違を使用して、例えば、コンジュゲーション過程の間の異なる反応速度論およびrHuPH20とのPEG結合に利用可能な潜在的な制限部位を提供できる。 30

【0271】

直鎖または分岐PEGのいずれかを含むスクシンイミジルPEG（上記の）を、rHuPH20にコンジュゲートできる。PEGを使用して、ヒアルロニダーゼあたり約3～6個のPEG分子を有する分子の組合せを含むrHuPH20を再現性よく作製できる。このようなPEG化rHuPH20組成物は、容易に精製し、約25,000または30,000ユニット／タンパク質1mgのヒアルロニダーゼ活性の比活性を有し、非PEG化rHuPH20を実質的に含まない（5%未満の非PEG化）組成物を得ることができる。 40

【0272】

種々のPEG試薬を使用して、例えば、mPEG-SBA（30kD）、mPEG-SMB（30kD）を使用して、ヒアルロナン分解酵素の例示的なもの、特に、可溶性ヒト組換えヒアルロニダーゼ（例えば、rHuPH20）を、また、mPEG2-NHS（40kD）、mPEG2-NHS（60kD）に基づいて分岐型を調製できる。rHuPH20のPEG化型は、以下の試薬の各々を使用して、NHS化学ならびにカルボネートおよびアルデヒドを使用して作製されている：mPEG2-NHS-40K分岐、mPEG-NHS-10K分岐、mPEG-NHS-20K分岐、mPEG-NHS-40K分岐 50

、mPEG2-NHS-60K分岐；mPEG-SBA-5K；mPEG-SBA-20K；mPEG-SBA-30K；mPEG-SMB-20K；mPEG-SMB-30K；mPEG-ブチリルデヒド（butyrldehyde）-；mPEG-SPA-20K；mPEG-SPA-30K；およびPEG-NHS-5K-ビオチン。PEG化ヒアルロニダーゼはまた、Dow Chemical Corporationの一部門であるDowpharmaから入手可能なPEG試薬を使用して調製されており；Dowpharmaのp-ニトロフェニルカルボネートPEG（30kDa）およびプロピオンアルデヒドPEG（30kDa）を用いてPEG化されたヒアルロニダーゼが挙げられる。

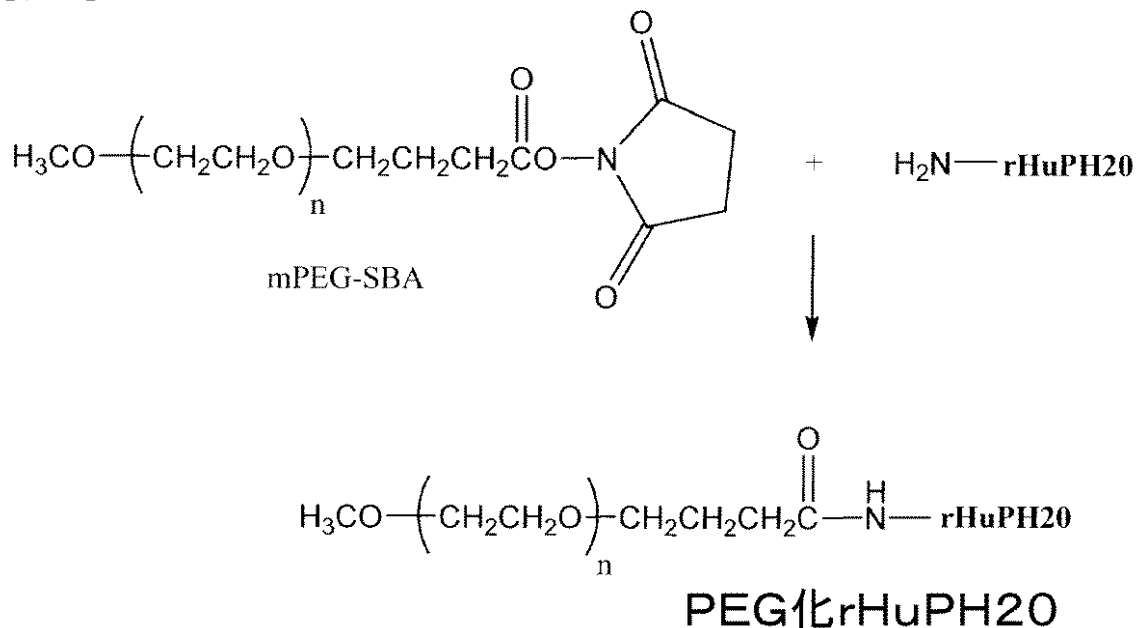
【0273】

一例では、ペグ化は、可溶性ヒアルロニダーゼへのmPEG-SBA、例えば、mPEG-SBA-30K（約30Kdaの分子量を有する）またはPEGブタン酸誘導体の別のスクシンイミジルエステルのコンジュゲーションを含む。mPEG-SBA-30KなどのPEGブタン酸誘導体のスクシンイミジルエステルは、タンパク質のアミノ基と容易にカップリングする。例えば、以下のスキーム1に示されるように、m-PEG-SBA-30KおよびrHuPH20の共有結合コンジュゲーション（大きさが約60KDaである）は、rHuPH20およびmPEGの間の安定なアミド結合を提供する。

スキーム1：

【0274】

【化1】



【0275】

通常、mPEG-SBA-30Kまたはその他のPEGをヒアルロナン分解酵素、いくつかの例では、ヒアルロニダーゼに、適したバッファー、例えば、pH6.8の130mM NaCl/10mM HEPES中、10:1のPEG:ポリペプチドモル比で付加し、続いて、滅菌、例えば、無菌濾過し、例えば、低温室中4℃で一晩攪拌しながらコンジュゲーションを継続する。一例では、コンジュゲートしているPEG-ヒアルロナン分解酵素を濃縮し、バッファーを交換する。

【0276】

mPEG-SBA-30KなどのPEGブタン酸誘導体のスクシンイミジルエステルをカップリングするその他の方法は、当技術分野で公知である（例えば、U.S. 5,672,662；U.S. 6,737,505；およびU.S. 2004/0235734参照）。例えば、ホウ酸塩バッファー（0.1M、pH8.0）中、4℃で1時間の反応によって、ヒアルロナン分解酵素（例えば、ヒアルロニダーゼ）などのポリペプチドを、NHS活性化PEG誘導体にカップリングできる。得られたPEG化タンパク質は、限外濾

過によって精製できる。あるいは、ウシアルカリホスファターゼのペグ化は、0.2 M リン酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl (pH 7.5) を含有するバッファー中、4℃で30分間、ホスファターゼを mPEG-SBA と混合することによって達成できる。未反応の PEG は、限外濾過によって除去できる。別の方法は、pH を 7.2~9 に上げるためにトリエチルアミンが加えられている脱イオン水中で、ポリペプチドを mPEG-SBA と反応させる。得られた混合物を、室温で数時間攪拌し、ペグ化を完了する。

【0277】

F. 組成物の調製、処方および投与

ポリマーとコンジュゲートしている修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の医薬組成物が、本明細書において提供される。また、ヒアルロナン関連疾患または状態と関連している疾患または障害を治療するために使用される第2の薬剤を含有する医薬組成物も提供される。このような薬剤の例示的なものとして、それだけには限らないが、薬物をはじめとする抗癌剤、ポリペプチド、核酸、抗体、ペプチド、小分子、遺伝子療法ベクター、ウイルスおよびその他の治療薬が挙げられる。修飾された可溶性ヒアルロニダーゼをはじめとする修飾されたヒアルロナン分解酵素は、過剰のヒアルロナンまたは蓄積されたヒアルロナンと関連している身体内の所望の部位または組織へのそのデリバリーを増強するために、第2の薬剤のような医薬処方と同時処方または同時投与投与できる。例えば、腫瘍は、蓄積されたヒアルロナンと関連している。このような過剰のヒアルロナンは、透水係数を妨げる一因となり得る。可溶性ヒアルロニダーゼ、特に、半減期を増大するようポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の導入は、このような組織におけるヒアルロナンの蓄積を相殺し、それによって、部位または組織内の透水係数を改善し、部位または組織を、局所または全身デリバリーのいずれかによる1つまたは複数の第2の薬剤のデリバリーに対してより感受性にできる。例えば、抗癌剤を含有する組成物と一緒にまたは別個に（断続的に、同時にまたは逐次）腫瘍に投与される場合に、腫瘍を、このような抗腫瘍物質に対してより感受性にできる、rHuPH20などのPEG化可溶性ヒアルロニダーゼの組成物が、本明細書において提供される。本明細書において別の場所で論じられるように、PEG化可溶性ヒアルロニダーゼの組成物はまた、蓄積されたヒアルロニダーゼ基質発現と関連している疾患または状態を治療するために単独で投与してもよい。

【0278】

化合物は、経口投与のための溶液、懸濁液、錠剤、分散性錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出处方またはエリキシル、ならびに、経皮パッチ処方および乾燥散剤吸入剤などの適した医薬処方に処方できる。通常、化合物は、当技術分野で周知の技術および手順を使用して医薬組成物に処方される（例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126参照）。一般に、処方の様式は、投与経路の関数である。組成物は同時処方してもよく、または別個の組成物として提供してもよい。

【0279】

一般に、組成物は、凍結乾燥形態または液体形態に処方される。組成物が凍結乾燥形態で提供される場合には、それらは、適当なバッファー、例えば、滅菌生理食塩水溶液によって使用の直前に再構成され得る。組成物は、一緒に提供されてもよく、または別個に提供されてもよい。本明細書における目的上、このような組成物は、通常、別個に提供される。可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素および第2の薬剤は、一緒に、逐次または断続的に投与するための別個の組成物としてパッケージングされ得る。組合せはキットとしてパッケージングされ得る。

【0280】

組成物は、筋肉内、静脈内、皮内、病巣内、腹膜内注射、皮下、腫瘍内、硬膜外、鼻腔、経口、経膈、直腸、局所 (topical)、局所 (local)、耳、吸入、口内（例えば、舌下）および経皮投与または任意の経路を含めた、当業者に公知の任意の経路による投与のために処方され得る。投与は、治療の部位に応じて局所、局所または全身であり得る。治療を必要とする領域への局所投与は、例えば、それだけには限らないが、手術

の際の局所注入、例えば、術後の創傷被覆材と併せた、注射による、カテーテルによる、坐剤による、または植込錠による局所適用によって達成できる。組成物はまた、その他の生物学的に活性な薬剤とともに、逐次、断続的に、または同一組成物中のいずれかで投与してよい。投与はまた、制御放出処方およびポンプなどによる装置によって制御された放出をはじめとする制御放出系を含み得る。

【0281】

任意の所与の場合における最も適した経路は、疾患の性質、疾患の進行、疾患の重篤度、使用される個々の組成物など、種々の因子に応じて変わる。本明細書における目的上、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素および／または第2の薬剤は、製薬上利用可能な量またはレベルが血漿中に存在するように投与されることが望ましい。例えば、組成物は、例えば、静脈内投与によって全身投与される。いくつかの場合には、このような組成物は、それらが蓄積されたヒアルロナンを有する皮膚または組織の間質に達するように投与される。例えば、可溶性ヒアルロニダーゼの腫瘍間質への導入は、間質液圧が低下し、拡散および／または結合性輸送が増大すると、腫瘍に、より容易に浸透できる、局所的にデリバリーされる、ならびに全身的に利用可能な抗癌剤のデリバリーを増強する。したがって、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素および1つまたは複数の第2の薬剤は、種々の投与経路によって投与できる。したがって、一例では、可溶性ヒアルロニダーゼは、局所的に (locally)、例えば、腫瘍内に、蓄積されたヒアルロナンと関連している部位または組織に投与され、第2の薬剤は、例えば、静脈内投与によって全身的に投与される。その他の投与様式も考慮される。医薬組成物は、各投与経路にとって適当な剤形に処方できる。

【0282】

投与方法を使用して、タンパク質分解などの分解過程ならびに抗原性および免疫原性応答による免疫学的介入への、ヒアルロナン分解酵素、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼのおよびその他の分子の曝露を低減できる。このような方法の例として、治療部位での局所投与が挙げられる。

【0283】

1. 処方

製薬上許容される組成物は、動物において、およびヒトにおいて使用するための一般に認識される薬局方に一致して用意された監督官庁またはその他の機関の承認を考慮して調製される。組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤および持続放出处方の形態をとり得る。組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドなどの担体とともに坐剤として処方できる。経口処方は、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムおよびその他のこのような薬剤などの標準担体を含み得る。処方は、投与様式に適合するべきである。

【0284】

医薬組成物は、一緒に酵素またはアクチベーターが投与される、希釈液、アジュバント、賦形剤またはビヒクルなどの担体を含み得る。適した製薬担体の例は、E. W. Martinによる "Remington's Pharmaceutical Sciences" に記載されている。このような組成物は、一般に、精製された形態の、治療上有効な量の化合物を、患者への適切な投与のための形態を提供するのに適した量の担体と一緒に含有する。このような製薬担体は、ピーナッツオイル、ダイズオイル、鉱油およびゴマ油などの、石油、動物、植物または合成起源のものをはじめとする、水および油状物質などの滅菌液体であり得る。医薬組成物が静脈内に投与される場合には、水が代表的な担体である。生理食塩水溶液およびデキストロース水溶液およびグリセロール溶液も特に、注射用溶液のための液体担体として使用できる。組成物は、有効成分とともに、ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムまたはカルボキシメチルセルロースなどの希釈液；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルクなどの滑沢剤；ならびにデンプン、アカシアゴムなどの天然ゴム、ゼラチン、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone)

e)、セルロースおよびその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよび当業者に公知のその他のこのような結合剤などの結合剤を含有し得る。適した製薬賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水およびエタノールが挙げられる。組成物はまた、必要に応じて、微量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤、例えば、酢酸、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、モノラウリン酸ソルビタン、酢酸トリエタノールアミンナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミンおよびその他のこのような薬剤を含有し得る。

【0285】

一例では、医薬品は液体の形態、例えば、溶液、シロップまたは懸濁液であり得る。このような液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用油脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアガム）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステルまたは精留植物油）；および保存料（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの製薬上許容される添加物を用いて従来手段によって調製できる。別の例では、医薬品は、使用前に水またはその他の適したビヒクルで再構成するための凍結乾燥形態で提示され得る。

【0286】

製薬上治療上活性な化合物およびその誘導体は、通常、単位剤形または複数回剤形で単位処方され、投与される。各単位用量は、必要な製薬担体、ビヒクルまたは希釈液と関連して、所望の治療効果を生じるのに十分な所定の量の治療上活性な化合物を含有する。単位剤形として、それだけには限らないが、適した量の化合物またはその製薬上許容される誘導体を含有する、錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、滅菌非経口溶液または懸濁液および経口溶液または懸濁液、およびオイル水エマルジョンが挙げられる。ユニット用量形態は、アンプルおよびシリンジまたは個々に包装された錠剤またはカプセル剤に含有され得る。単位用量形態は、画分またはその複数のもので投与され得る。複数回用量形態は、分離された単位用量形態で投与される、単一容器中にパッケージングされている複数の同一の単位剤形である。複数回用量形態の例として、バイアル、錠剤またはカプセル剤の瓶またはポイントもしくはガロンの瓶が挙げられる。したがって、複数回用量形態は、パッケージング中で分離されていない単位用量の複数である。一般に、非毒性担体から作られる平衡を有する0.005%~100%の範囲の有効成分を含有する剤形または組成物を調製できる。

【0287】

医薬組成物は、各投与経路にとって適当な剤形で処方できる。

【0288】

a. 注射用医薬品、溶液およびエマルジョン

一般に、皮下に、筋肉内に、腫瘍内に、静脈内に、または皮内にのいずれかでの注射を特徴とする非経口投与が、本明細書において考慮される。注射物質は、液体溶液または懸濁液、注射前の液体での溶液または懸濁液に適した固体形態、またはエマルジョンのいずれかとして従来形態で調製できる。適した賦形剤として、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールがある。さらに、必要に応じて、投与される医薬組成物は、pH緩衝剤、金属イオン塩またはその他のこのようなバッファーなどの溶媒の形態でアクチベーターを含有してもよい。医薬組成物はまた、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解度エンハンサー、ならびに例えば、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンおよびシクロデキストリンなどのその他のこのような薬剤などのその他の微量の非毒性補助物質も含有し得る。一定レベルの投与量が維持されるような徐放系または持続放出系の埋め込み（例えば、米国特許第3,710,795号参照）も本明細書において考慮される。このような非経口組成物に含有される活性な化合物のパーセンテージは、その固有の性質ならびに化合物の活性および対象の要求に高度に依存している。

10

20

30

40

50

【0289】

例えば、本明細書において提供される修飾された可溶性ヒアルロニダーゼの標準の安定化処方、EDTA、NaCl、CaCl₂、ヒスチジン、ラクトース、アルブミン、Pluronic（登録商標）F68、TWEEN（登録商標）および／またはその他の界面活性剤またはその他の同様の薬剤のうち1種または複数とともに処方される。例えば、本明細書において提供される組成物は、pHバッファー（例えば、ヒスチジン、リン酸またはその他のバッファーなど）、または酸性バッファー（酢酸、クエン酸、ピルビン酸、Gly-HCl、コハク酸、乳酸、マレイン酸またはその他のバッファーなど）、張性調節剤（tonicity modifier）（例えば、アミノ酸、ポリアルコール、NaCl、トレハロース、その他の塩および／または糖など）、安定剤、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸塩またはカルシウムEDTAなどのキレート化剤、メチオニン、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩、クエン酸／クエン酸塩またはアルブミンなどの脱酸素剤および／または芳香環を含有する防腐剤（例えば、フェノールまたはクレゾール）などの防腐剤のうち1種または複数を含む。ヒアルロニン分解酵素を含有する組成物にとって有用な例示的安定化剤として、ポリソルベートなどの界面活性剤およびヒト血清アルブミンなどのタンパク質が挙げられる。本明細書における組成物において有用である血清アルブミンの例示的濃度として、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mLまたは1mg/mLが挙げられるが、程度の差はあり得る。ポリソルベートはまた、例えば、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%もしくは0.1%または約0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%もしくは0.1%の濃度で組成物に存在し得る。カルシウムEDTA（CaEDTA）などの金属キレート化剤も、例えば、約0.02mM～20mMの間、例えば、0.02mM、0.04mM、0.06mM、0.08mM、0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、5mM、10mM、15mM、20mMまたはそれ以上の濃度で存在し得る。組成物のpHおよび浸透圧は、組成物の所望の活性および安定性の条件を最適化するように当業者によって調整できる。いくつかの例では、本明細書において提供される組成物は、100mOsm/kg、120mOsm/kg、140mOsm/kg、160mOsm/kg、180mOsm/kg、200mOsm/kg、220mOsm/kg、240mOsm/kg、260mOsm/kg、280mOsm/kg、300mOsm/kg、320mOsm/kg、340mOsm/kg、360mOsm/kg、380mOsm/kg、400mOsm/kg、420mOsm/kg、440mOsm/kg、460mOsm/kg、500mOsm/kgもしくはそれ以上または約100mOsm/kg、120mOsm/kg、140mOsm/kg、160mOsm/kg、180mOsm/kg、200mOsm/kg、220mOsm/kg、240mOsm/kg、260mOsm/kg、280mOsm/kg、300mOsm/kg、320mOsm/kg、340mOsm/kg、360mOsm/kg、380mOsm/kg、400mOsm/kg、420mOsm/kg、440mOsm/kg、460mOsm/kg、500mOsm/kgもしくはそれ以上の浸透圧および6、6.2、6.4、6.6、6.8、7、7.2、7.4、7.6、7.8もしくは8のpHまたは約6、6.2、6.4、6.6、6.8、7、7.2、7.4、7.6、7.8もしくは8のpHを有する。

【0290】

通常、本明細書における処方中、NaClは、例えば、100mM～150mMもしくはそれ以上または約100mM～150mMもしくはそれ以上の量で提供される。例えば

、例示的処方は、10 mMまたは約10 mMヒスチジンおよび／または130 mMもしくは約130 mM NaClで含有し得る。その他の処方は、さらに、あるいは、ラクトースを例えば、13 mg/mlまたは約13 mg/mlで含有し得る。さらに、それだけには限らないが、チオメルサルをはじめとする抗菌剤または抗真菌剤が処方中に存在し得る。処方は、アルブミン、Pluronic（登録商標）F68、TWEEN（登録商標）および／またはその他の界面活性剤をさらに含有し得る。処方は、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3もしくは7.4または約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3もしくは7.4、通常、pH 6.5または約pH 6.5であるpHで提供される。本明細書において使用するための修飾された可溶性ヒアルロニダーゼの濃縮処方は、通常、適当な塩濃度を維持するよう、投与に先立って生理食塩水溶液またはその他の塩緩衝溶液で希釈される。

10

【0291】

注射物質は、局所投与および全身投与のために設計される。本明細書における目的上、蓄積された、または過剰のヒアルロナンと関連している患部間質への直接投与のために局所投与が望ましい。非経口投与のための処方として、注射用に準備された滅菌溶液、皮下錠剤をはじめとする、使用の直前に溶媒と組み合わせられるよう準備された凍結乾燥散剤などの滅菌乾燥可溶性製品、注射のために準備された滅菌懸濁液、使用の直前にビヒクルと組み合わせられるよう準備された滅菌乾燥不溶性製品および滅菌エマルジョンが挙げられる。溶液は、水性または非水性のいずれかであり得る。静脈内に投与される場合には、適した担体として、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、ならびにグルコース、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールおよびそれらの混合物などの増粘剤および可溶化剤を含有する溶液が挙げられる。

20

【0292】

非経口処方において使用される製薬上許容される担体として、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、バッファー、抗酸化物質、局所麻酔、懸濁剤および分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖剤またはキレート化剤およびその他の製薬上許容される物質が挙げられる。水性ビヒクルの例として、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、等張ブドウ糖注射液、注射用滅菌水、ブドウ糖および乳酸リンガー注射液が挙げられる。非水性非経口ビヒクルとして、植物起源の硬化油、綿実油、コーンオイル、ゴマ油およびピーナッツオイルが挙げられる。静菌濃度または静真菌濃度の抗菌剤を、複数回用量容器にパッケージングされた非経口処方に加えることができ、これとして、フェノールまたはクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルおよびプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムが挙げられる。等張剤として、塩化ナトリウムおよびデキストロースが挙げられる。バッファーとして、リン酸およびクエン酸が挙げられる。抗酸化物質として、重硫酸ナトリウムが挙げられる。局所麻酔として、塩酸プロカインが挙げられる。懸濁剤および分散剤として、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンが挙げられる。乳化剤として、ポリソルベート80（TWEENS 80）が挙げられる。金属イオンの金属イオン封鎖剤またはキレート化剤として、EDTAが挙げられる。製薬担体としてまた、水混和性ビヒクルのためのエチルアルコール、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールおよびpH調整のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸または乳酸も挙げられる。

30

40

【0293】

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

。

【0294】

製薬上活性な化合物の濃度は、注射が、所望の薬理学的効果を生じるのに有効な量を提

50

供するよう調整される。本明細書において別の場所で論じられるように、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼは、 3 U/mL または約 3 U/mL の血漿中のヒアルロニダーゼを維持するのに十分な量で提供される。正確な用量は、当技術分野で公知であるように、年齢、体重および患者または動物の状態に応じて変わる。単位用量非経口処方、アンプル、バイアルまたは針をつけたシリンジ中にパッケージングされる。製薬上活性な化合物を含有する、液体溶液または再構成された粉末処方の容量は、治療される疾患およびパッケージのために選択される個々の製品の関数である。非経口投与用のすべての処方、当技術分野で公知であり、実施されているように無菌でなくてはならない。

【0295】

b. 凍結乾燥散剤

溶液、エマルジョンおよびその他の混合物として投与するために再構成され得る凍結乾燥散剤が、本明細書において注目される。それらはまた、固体またはゲルとしても再構成され処方され得る。

【0296】

滅菌凍結乾燥散剤は、可溶性ヒアルロニダーゼの化合物および／または第2の薬剤を、バッファー溶液に溶解することによって調製する。バッファー溶液は、散剤または散剤から調製された再構成された溶液の安定性またはその他の薬理学的成分を改善する賦形剤を含有し得る。その後の溶液の滅菌濾過と、それに続く、当業者に公知の標準条件下での凍結乾燥によって、所望の処方が提供される。手短には、デキストロース、ソルビタル、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロースまたはその他の適した薬剤などの賦形剤を、クエン酸、リン酸ナトリウムもしくはカリウムなどの適したバッファーまたは当業者に公知のその他のこのようなバッファーに溶解することによって凍結乾燥散剤を調製する。次いで、得られた混合物に選択された酵素を加え、溶解するまで攪拌する。得られた混合物を滅菌濾過し、粒子状物質を除去するよう処理し、無菌性を確実にし、凍結乾燥のためのバイアルに分配する。各バイアルは、化合物の単回投与量（ $1\text{ mg} \sim 1\text{ g}$ 、通常、 $1 \sim 100\text{ mg}$ 、例えば、 $1 \sim 5\text{ mg}$ ）または複数回投与量を含む。凍結乾燥散剤は、約 $4^\circ\text{C} \sim$ 室温でなど、適当な条件下で保存できる。

【0297】

この凍結乾燥散剤のバッファー溶液を用いる再構成によって、非経口投与において使用するための処方が提供される。正確な量は、治療される適応症および選択される化合物に応じて変わる。このような量は、経験的に決定することができる。

【0298】

c. 局所投与

局所混合物は、局所投与および全身投与について記載されたとおりに調製する。得られた混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョンなどであり得、クリーム、ゲル、軟膏、エマルジョン、溶液、エリキシル、ローション、懸濁液、チンキ、ペースト、発泡物質、エアロゾル、灌水、噴霧剤、坐剤、絆創膏、皮膚パッチまたは任意の局所投与に適したその他の処方として処方される。

【0299】

化合物またはその製薬上許容される誘導体は、吸入などによる局所適用のためのエアロゾルとして処方できる（例えば、炎症性疾患、特に喘息を治療するために有用なステロイドのデリバリーのためのエアロゾルを記載する米国特許第4,044,126号、同4,414,209号および同4,364,923号参照）。気道に投与するためのこれらの処方、単独またはラクトースなどの不活性担体と組み合わせた、噴霧器用のエアロゾルもしくは溶液、または吹送用の超微粒粉末のような形態であり得る。このような場合には、処方の粒子は、通常、 50 ミクロン 未満、好ましくは、 10 ミクロン 未満の直径となる。

【0300】

化合物は、ゲル、クリームおよびローションの形態で、皮膚および眼などにおける粘膜への局所適用、眼への適用に、または大槽内もしくは脊髄内適用など、局所適用ま

10

20

30

40

50

たは局所適用用に処方できる。局所投与は、経皮デリバリー用に、また眼もしくは粘膜への投与用に、または吸入治療用に考慮される。活性な化合物の、単独またはその他の製薬上許容される賦形剤と組み合わせた鼻腔溶液も投与できる。

【0301】

経皮投与に適した処方が提供される。それらは、レシピエントの表皮と長期間密接に接触したままにするよう適合された個別のパッチなど、任意の適した形式で提供され得る。このようなパッチは、例えば、活性な化合物に関して0.1～0.2 Mの濃度の活性な化合物を、所望により緩衝された水溶液中に含有する。経皮投与に適した処方または、イオン導入法によってデリバリーでき（例えば、Pharmaceutical Research 3(6)、318 (1986) 参照）、通常、活性な化合物の所望により緩衝された水溶液の形態をとる。

10

【0302】

d. その他の投与経路のための組成物

本明細書では、治療される状態に応じて、局所適用、経皮パッチ、経口および直腸投与などのその他の投与経路も考慮される。例えば、直腸投与のための薬剤剤形として、全身効果のための、直腸用坐剤、カプセル剤および錠剤がある。直腸用坐剤は、体温で融解または軟化し、1種または複数の薬理学的に、または治療上有効な成分を放出する、直腸への挿入のための固形物を含む。直腸用坐剤に使用される製薬上許容される物質として、融点を上げるための、基剤またはビヒクルおよび薬剤がある。基剤の例として、ココアバター（テオブロマ（theobroma）油）、グリセリンゼラチン、カルボワックス（carbowax）（ポリオキシエチレングリコール）ならびに脂肪酸のモノー、ジーおよびトリグリセリドの適当な混合物が挙げられる。種々の基剤の組合せを使用できる。坐剤の融点を上げるための薬剤として、鯨蝟およびワックスが挙げられる。直腸用坐剤は、圧縮法または成形のいずれかによって調製できる。直腸用坐剤の通常重量は、約2～3 gmである。直腸投与のための錠剤およびカプセル剤は、経口投与のための処方についてと同じ製薬上許容される物質を使用し、同じ方法によって製造する。

20

【0303】

直腸投与に適した処方は、単位用量坐剤として提供され得る。これらは、活性化合物を、1種または複数の従来の固体担体、例えば、ココアバターと混合すること、次いで、得られた混合物を成形することによって調製できる。

【0304】

経口投与には、医薬組成物は、例えば、結合剤（例えば、プレゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの）；増量剤（例えば、ラクトース、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプナンまたはグリコール酸ナトリウムデンプン）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなどの製薬上許容される賦形剤を用いて従来の手段によって調製される錠剤またはカプセル剤の形態をとり得る。錠剤は、当技術分野で周知の方法によってコーティングしてもよい。

30

【0305】

口内（舌下）投与に適した処方として、例えば、フレーバーのつけられた基剤、通常、スクロースおよびアラビアガムまたはトラガカント中に活性な化合物を含有するロゼンジ剤；およびゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアラビアガムなどの不活性基剤中に化合物を含有するトローチ剤が挙げられる。

40

【0306】

医薬組成物はまた、制御放出処方および／またはデリバリー装置によって投与できる（例えば、米国特許第3,536,809号；同3,598,123号；同3,630,200号；同3,845,770号；同3,847,770号；同3,916,899号；同4,008,719号；同4,687,610号；同4,769,027号；同5,059,595号；同5,073,543号；同5,120,548号；同5,354,566号；同5,591,767号；同5,639,476号；同5,674,533号お

50

よび同 5, 7 3 3, 5 6 6 号中を参照)。

【0307】

それだけには限らないが、リボソームへの封入、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現できる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスおよびレトロウイルスデリバリー系などの可溶性ヒアルロニダーゼをコードする核酸分子またはその他の薬剤のデリバリーなど、種々のデリバリー系が公知であり、選択された組成物を投与するために使用できる。

【0308】

したがって、特定の実施形態では、本明細書における組成物の投与に関してリボソームおよび／またはナノ粒子も使用できる。リボソームは、水性媒体中に分散され、多重膜同心性二層小胞（多重膜小胞（MLV）とも呼ばれる）を自発的に形成するリン脂質から形成される。MLVは、通常、25 nm～4 μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、コア中に水溶液を含有する200～500オングストロームの範囲の直径を有する小さな一枚膜小胞（small unilamellar vesicles）（SUV）の形成をもたらす。

【0309】

リン脂質は、脂質対水のモル比に応じて、水中に分散されると、リボソーム以外の種々の構造を形成し得る。低い比では、リボソームが生じる。リボソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価のカチオンの存在に応じて変わる。リボソームは、イオン性物質および極性物質に対して低い透過性を示し得るが、高温下では、その透過性を著しく変更する相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として知られる、ぎっしりと詰まっている、正しく並べられた構造から、流体状態として知られる、ゆるく詰まっている、あまり正しく並べられていない構造への変化を含む。これは、特有の相転移温度で起こり、イオン、糖および薬物に対する透過性の増大をもたらす。

【0310】

リボソームは、種々の機序：マクロファージおよび好中球などの細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水性力もしくは静電気力、または細胞表面成分との特異的相互作用のいずれかによる細胞表面への吸着；細胞膜へのリボソームの脂質二重層の挿入による形質細胞膜との融合およびリボソーム内容物の細胞室への同時放出；およびリボソーム内容物の関連は全くない、細胞膜または細胞内膜へのリボソーム脂質の、またはその逆の移動によって細胞と相互作用する。リボソーム処方を変更することは、どの機序が働くかを変更し得るが、2以上が同時に働く場合もある。ナノカプセルは、通常、安定な再現性のある方法で化合物を封入できる。細胞内ポリマー過負荷による副作用を避けるために、このような超微粒子（約0.1 μmの大きさの）は、in vivoで分解され得るポリマーを使用して設計されなくてはならない。これらの必要条件を満たす生分解性ポリアルキルシシアノアクリレートナノ粒子が、本明細書における使用のために考慮され、このような粒子は容易に製造できる。

【0311】

2. 用法用量

活性な薬剤、例えば、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素および／または第2の薬剤は、治療される患者に対する望ましくない副作用がなく、治療上有効な効果を発揮するのに十分な量で含まれる。例えば、本明細書において別の場所に記載されるように、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼは、血漿中少なくとも3 U/mLまたは約3 U/mL、通常、3 U/mL～12 U/mL以上、例えば、約4 U/mL、5 U/mL、6 U/mL、7 U/mL、8 U/mL、9 U/mL、10 U/mL、11 U/mL、12 U/mL、13 U/mL、14 U/mL、15 U/mL、16 U/mL、17 U/mL、18 U/mL、19 U/mL、20 U/mL、25 U/mL、30 U/mL、35 U/mL、40 U/mL、45 U/mL、50 U/mL以上のレベルで維持するのに十分な量で全身投与のために処方される。

【0312】

血液中、少なくとも 3 U/mL のヒアルロニダーゼを維持するための、修飾されたヒアルロナン (hyaluron) 分解酵素、例えば、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼの量を決定することは、当業者のレベルの範囲内である。血液中のヒアルロニダーゼのレベルは、血液中に十分な量のヒアルロニダーゼが存在することを確実にするために経時的にモニタリングできる。血漿中のヒアルロニダーゼを測定するための当業者に公知の任意のアッセイを実施してよい。例えば、本明細書において例に記載されるマイクロ濁度アッセイまたは酵素アッセイを、血漿中のタンパク質で実施できる。血漿は、通常、ヒアルロニダーゼ酵素を含むということは理解される。このような血漿ヒアルロニダーゼ酵素は、通常、酸性 pH で活性を有する (米国特許第 7, 105, 330 号)。従って、修飾された酵素を用いる治療の前に、ヒアルロニダーゼの血漿レベルを決定し、ベースラインとして使用するべきである。治療後の血漿ヒアルロニダーゼレベルのその後の測定を、治療前のレベルと比較することができる。あるいは、アッセイは、普通は、酸性 pH で活性を示す血漿中の内因性リポソームヒアルロニダーゼ活性を抑制する pH 条件下で実施してもよい。したがって、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼが中性 pH で活性である場合は (例えば、ヒト PH 20)、修飾された中性で活性な可溶性ヒアルロニダーゼのレベルのみが測定される。

10

【0313】

活性な薬剤を含有する組成物は、製薬上許容される担体を含み得る。治療上有効な濃度は、本明細書において提供されるアッセイなどの公知の *in vitro* および *in vivo* 系で化合物を調べることによって経験的に決定できる。組成物中の可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素または第 2 の薬剤の濃度は、複合体の吸収、不活性化および排泄速度、複合体の物理化学的特徴、投与スケジュールおよび投与される量ならびに当業者に公知のその他の因子に応じて変わる。例えば、正確な投与量および治療期間は、治療されている組織の関数であり、公知の試験プロトコールを使用して経験的に、または *in vivo* もしくは *in vitro* 試験データからの外挿によって決定でき、および/または個々の薬剤の既知投与計画から決定できるということは理解される。例えば、抗癌剤などのヒアルロナン関連疾患および状態の治療のための薬剤および治療は、当技術分野で周知である。したがって、組成物中の第 2 の薬剤の投与量は、所与の投与経路下のその薬剤の標準的な投与計画に基づいて選択できる。

20

【0314】

濃度および投与量の値はまた、治療される個体の年齢とともに変わるということは留意すべきである。任意の特定の対象について、固有の投与計画は、個体の必要性および処方を投与するか、処方の投与を監督する専門家としての判断にしたがって経時的に調整されるべきであるということ、および本明細書において示される濃度範囲は、単に例示的なものであって、その範囲を制限するよう意図されるものではないということはさらに理解されるべきである。組成物は、毎時間、毎日、毎週、毎月、毎年または 1 度だけ投与してもよい。通常、投与計画は、毒性を制限するよう選択される。主治医は、毒性または骨髄、肝臓もしくは腎臓もしくはその他の組織機能障害のために投与量を下げるために、治療をどのように、いつ、終結、中断または調整するかを承知しているということは留意されるべきである。反対に、主治医はまた、臨床反応が適切ではない場合に (毒性副作用を除いて)、治療を、より高いレベルにどのように、いつ調整するかを承知している。

30

40

【0315】

疾患または状態、例えば、HA が豊富な腫瘍などのヒアルロナン関連疾患または状態の治療のために投与されるべき、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の量は、標準臨床技術によって決定できる。さらに、*in vitro* アッセイおよび動物モデルを使用して、最適投与量範囲を同定するのを補助することができる。経験的に決定できる正確な投与量は、個々の酵素、投与経路、治療される疾患の種類および疾患の重篤度に応じて変わり得る。例示的投与量範囲は、ポリマーとコンジュゲートしている、50 ユニット ~ 50,000,000 ユニットまたは約 50 ユニット ~ 50,000,000 ユニットの可溶性ヒアルロニダーゼあるいはポリマーとコンジュゲートしている、機能的に

50

同等な量の別のヒアルロナン分解酵素である。本明細書において、活性のユニットは、標準活性、例えば、ヒアルロニダーゼ活性をアッセイするマイクロ濁度アッセイにおいて測定されるような活性に対して正規化されるということは理解される。

【0316】

ポリマーとコンジュゲートしている可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、PEG化可溶性ヒアルロニダーゼは、1 mgの総タンパク質あたり、より低い活性を示す、すなわち、そのようにコンジュゲートしていない天然可溶性ヒアルロニダーゼと比較して、より低い比活性を示し得る。例えば、本明細書において別の場所で記載されるように、例示的 rHuPH20 調製物は、120,000 ユニット/mg の比活性を示すのに対し、rHuPH20 の PEG 化型は、30,000 ユニット/mg の比活性を示す。通常、rHuPH20 の PEG 化型は、26,000 または約 26,000 から 38,000 または約 38,000 U/mg の間の範囲内の比活性を示す。したがって、同等のユニットの活性を達成するには、より多量の総タンパク質が必要である。例えば、ポリマーとコンジュゲートしている、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、同一ユニットの、そのようにコンジュゲートしていない可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の活性を達成するには、1.5 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍またはそれ以上の総タンパク質 (mg で) を必要とする。しかし、本明細書における目的上、投与量はユニットを基準にしている。

【0317】

したがって、例えば、ポリマー、例えば、PEG とコンジュゲートしている、本明細書において提供される可溶性ヒアルロニダーゼは、10~50,000,000 ユニット、10~40,000,000 ユニット、10~36,000,000 ユニット、10~12,000,000 ユニット、10~1,200,000 ユニット、10~1,000,000 ユニット、10~500,000 ユニット、100~100,000 ユニット、500~50,000 ユニット、1000~10,000 ユニット、5000~7500 ユニット、5000 ユニット~50,000 ユニット、もしくは 1,000~10,000 ユニットまたは約 10~50,000,000 ユニット、10~40,000,000 ユニット、10~36,000,000 ユニット、10~12,000,000 ユニット、10~1,200,000 ユニット、10~1,000,000 ユニット、10~500,000,000 ユニット、100~100,000 ユニット、500~50,000 ユニット、1000~10,000 ユニット、5000~7500 ユニット、5000 ユニット~50,000 ユニット、もしくは 1,000~10,000 ユニットで投与できる。ヒアルロニダーゼではないヒアルロナン分解酵素がポリマーとコンジュゲートしている場合には、10~50,000,000 ユニット、10~40,000,000 ユニット、10~36,000,000 ユニット、10~12,000,000 ユニット、10~1,200,000 ユニット、10~1,000,000 ユニット、10~500,000 ユニット、100~100,000 ユニット、500~50,000 ユニット、1000~10,000 ユニット、5000~7500 ユニット、5000 ユニット~50,000 ユニットもしくは 1,000~10,000 ユニットまたは約 10~50,000,000 ユニット、10~40,000,000 ユニット、10~36,000,000 ユニット、10~12,000,000 ユニット、10~1,200,000 ユニット、10~1,000,000 ユニット、10~500,000 ユニット、100~100,000 ユニット、500~50,000 ユニット、1000~10,000 ユニット、5000~7500 ユニット、5000 ユニット~50,000 ユニットもしくは 1,000~10,000 ユニットと機能的に同等である量で投与できる。

【0318】

一般に、本明細書における目的上、血漿中、少なくとも 3 U/mL のヒアルロニダーゼを維持するために、0.02 mg/kg (対象の)、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.15 mg/kg、0.2 mg/kg

g、0.25mg/kg、0.30mg/kg、0.35mg/kg、0.40mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kgもしくはそれ以上または約0.02mg/kg（対象の）、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.30mg/kg、0.35mg/kg、0.40mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kgもしくはそれ以上が投与される。一般に、修飾されたヒアルロニダーゼの比活性は、20,000U/mg～60,000U/mgまたは約20,000U/mg～60,000U/mgであり、一般に、35,000U/mg、60,000U；70,000U；80,000U；90,000U；100,000U；200,000U；300,000U；400,000U；500,000U；600,000U；700,000U；800,000U；900,000U；1,000,000U；1,500,000U；2,000,000U；2,500,000U；3,000,000U；3,500,000U；4,000,000Uもしくはそれ以上または約35,000U/mg、60,000U；70,000U；80,000U；90,000U；100,000U；200,000U；300,000U；400,000U；500,000U；600,000U；700,000U；800,000U；900,000U；1,000,000U；1,500,000U；2,000,000U；2,500,000U；3,000,000U；3,500,000U；4,000,000Uもしくはそれ以上である場合に投与される。

【0319】

通常、本明細書において考慮されるヒアルロニダーゼの注射剤または注入剤の容積は、0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、20ml、30ml、40ml、50mlもしくはそれ以上または約0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、15ml、20ml、30ml、40ml、50mlもしくはそれ以上である。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、50U/ml、100U/ml、150U/ml、200U/ml、400U/mlもしくは500U/mlまたは約50U/ml、100U/ml、150U/ml、200U/ml、400U/mlもしくは500U/ml（または機能的に同等な量）で保存溶液として提供され得、または直接的に使用するため、もしくは使用前に有効な濃度に希釈するために、より濃縮された形態で、例えば、1000U/ml、1500ユニット/ml、2000U/ml、4000U/mlもしくは5000U/mlまたは約1000U/ml、1500ユニット/ml、2000U/ml、4000U/mlもしくは5000U/mlで提供され得る。投与される可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の容量は、必要とされる投与量の関数であるが、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の濃度、利用可能な保存処方に応じて変わり得る。例えば、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、約50mlを超える用量では投与されず、通常、5～30mlの容量、一般に、約10mlを超えない容量で投与されることが本明細書において考慮される。高容量には、医師の裁量でシリンジポンプを使用できる。投与のタイミングもまた、治療医師によって調整できる。例えば、静脈内に投与される場合には、シリンジポンプを使用して、1分、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30またはそれ以上の分数の期間、一般に、15または約15分をかけて組成物を投与できる。可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、液体または凍結乾燥処方として提供され得る。凍結乾燥処方が、大きなユニット用量のヒアル

ロナン分解酵素の保存にとって理想的である。

【0320】

一例では、疾患または状態を治療するためのヒアルロナン分解酵素および第2の薬剤または治療を投与することによって、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素が併用療法の一部として投与される。一例では、ヒアルロナン分解酵素および第2の薬剤または治療は、同時処方し、一緒に投与できる。別の例では、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、第2の薬剤または治療調製物に続いて、断続的にまたは同時に投与される。一般に、ヒアルロナン分解酵素は、第2の薬剤または治療調製物の投与に先立って投与され、ヒアルロナン分解酵素が、対象の細胞、組織または流体、例えば、間質空間、細胞外マトリックス、腫瘍組織、血液またはその他の組織中のヒアルロン酸を分解するのを可能にする。例えば、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、第2の薬剤調製物の投与に、0.5分、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、20分、30分、1時間またはそれ以上先だって投与できる。いくつかの例では、ヒアルロナン分解酵素は、第2の薬剤調製物と一緒に投与される。当業者には当然であろうが、同時投与の所望の近接性は、かなりの部分、特定の組織環境における薬剤の効果半減期、治療されている特定の疾患に応じて変わり、適した動物モデルなど、適したモデルにおいてさまざまな時点で薬剤を投与することの効果調べることによって容易に最適化できる。いくつかの状態では、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与の最適なタイミングは、60分を越える。

【0321】

1つまたは複数の第2の薬剤または治療の調製物は、1回で投与してもよく、時間間隔において投与される、いくつかのより小さい用量に分割できる。選択された薬剤／治療調製物は、治療時間の過程にわたって、例えば、数時間、数日、数週間または数カ月わたって、1または複数の用量で投与できる。いくつかの場合には、連続投与が有用である。正確な投与量および投与の経過は、適応症および患者の耐容性に応じて変わるということは理解される。一般に、本明細書における第2の薬剤／治療の投与計画は、当業者に知られている。

【0322】

3. 併用療法

本明細書に記載される組成物または組合せのいずれも、ヒアルロナン関連癌を治療するための手順、例えば、薬剤または治療などの、その他の治療薬または薬理作用物質または治療と一緒に、それに先立って、それと断続的に、またはその後、さらに同時処方または同時投与できる。このような薬剤として、それだけには限らないが、生物製剤、小分子化合物、分散剤、麻酔薬、血管収縮剤および手術ならびにそれらの組合せが挙げられる。本明細書において例示されるすべてのものを含め、疾患または状態の治療のために利用可能である、このようなその他の薬剤および治療は、当業者に公知であり、経験的に決定できる。別の例では、局所麻酔薬、例えば、リドカインを投与して、疼痛緩和を提供できる。いくつかの例では、麻酔は、麻酔効果の期間を増大するために血管収縮薬と組み合わせて提供され得る。

【0323】

したがって、一例では、本明細書において提供される組成物を、局所麻酔と同時処方または同時投与できる。麻酔として、短時間作用型および持続性局所麻酔薬処方挙げられる。短時間作用型局所麻酔薬処方は、生理食塩水またはその他の適した注射用ビヒクルに溶解したリドカインまたは関連局所麻酔薬を含有する。通常、短時間作用型局所麻酔薬を用いる局所麻酔は、約20～30分持続する。例示的麻酔薬として、例えば、アンブカイン (ambucaines)；アモキシカイン (amoxecaines)；アミロカイン；アプトカイン (aptocaines)；アルチカイン；ベノキシネート；ベンジルアルコール；ベンゾカイン；ベトキシカイン (betoxycaines)；ビフェナミン；ブクリカイン (bucricaines)；ブメカイン (bumecaines)；ブピバカイン；ブタカイン；ブタムベン；ブタニリカイン；カルビゾカイン (carb i

zocaines) ; クロロプロカイン ; クリブカイン (clibucaines) ; クロダカイン (clodacaines) ; コカイン ; デキシバカイン (dexivacaines) ; ジアモカイン (diamocaines) ; ジブカイン ; ジクロニン ; エルカイン (elucaines) ; エチドカイン ; ユープロシン (euprocins) ; フェキシカイン (fexicaines) ; フォモカイン (fomocaines) ; ヘプタカイン (heptacaines) ; ヘキシルカイン ; ヒドロキシプロカイン ; ヒドロキシテトラカイン ; イソブタムベン ; ケトカイン (ketocaines) ; ロイシノカイン (leucinocaines) ; リドカイン ; メピバカイン ; メプリルカイン ; オクトカイン (octocaines) ; オルトカイン (orthocaines) ; オキセタキアン (oxethacaines) ; オキシブプロカイン ; フェナカイン (phenacaines) ; ピノールカイン (pinolcaines) ; ピペロカイン (piperocaines) ; ピリドカイン (piridocaines) ; ポリドカノール ; プラモカイン ; プリロカイン ; プロカイン ; プロパノカイン (propanocaines) ; プロピポカイン (propipocaines) ; プロボキシカイン ; プロキシメタカイン ; ピロカイン (pyrrocaines) ; クアタカイン (quatacaines) ; キニソカイン ; リソカイン (risocaines) ; ロドカイン (rodocaines) ; ロピバカイン ; サリチルアルコール ; スイカイン (suicaines) ; テトラカイン ; トラペンカイン (trapencaine) ; およびトリメカインなどの非吸入局所麻酔ならびにアルファキサロン ; アモラノン (amolanonones) ; エトキサドロール (etoxadrols) ; フェンタニル ; ケタミン ; レボキサドロール (levoxadrols) ; メチツラル (methitural) ; メトヘキシタール ; ミダゾラム ; ミナキソロン (minaxolones) ; プロパニジド ; プロボキサート (propoxates) ; プラモキシシン ; プロポフォル ; レミフェンタニル ; スフェンタニル ; チレタミン ; およびゾラミン (zolamine) などの種々のその他の非吸入麻酔薬が挙げられる。処方中の有効量は、個々の患者、治療される疾患、投与経路およびその他の検討事項に応じて変わる。このような投与量は、経験的に決定できる。

【0324】

局所麻酔の短い半減期のために、このような麻酔薬を血管収縮薬と同時投与または同時処方することが望ましいことが多い。血管収縮剤の例として、カテコールアミンおよびカテコールアミン誘導体をはじめとする α アドレナリン受容体アゴニストが挙げられる。特定の例として、それだけには限らないが、レボノルデフリン (levonordefrin) 、エピネフリンおよびノルエピネフリンが挙げられる。例えば、リドカインなどの局所麻酔薬処方、低濃度のエピネフリンまたはレボノルデフリンなどの別のアドレナリン受容体アゴニストを含有するよう処方できる。局所麻酔薬を、アドレナリン受容体アゴニストと組み合わせることは、医薬品においてよく見られる（例えば、米国特許第7, 261, 889号および同5, 976, 556号参照）。麻酔薬の半減期を増大するために血管収縮薬が必要である。エピネフリンなどの血管収縮薬は、注射された組織中の血管上の α -アドレナリン受容体を刺激する。これは、組織中の血管を収縮させる効果を有する。血管収縮は、局所麻酔薬を組織中により長くとどまるようにさせ、その結果、麻酔効果期間が大きく増大する。

【0325】

通常、本明細書において血管収縮薬は、麻酔薬と組み合わせて使用される。麻酔薬および血管収縮薬は、単一の医薬組成物の一部として一緒に、または血管収縮薬が、麻酔薬が投与された場所の近くの血管を収縮するよう作用し、麻酔の延長をもたらす限り、別個の医薬組成物の一部として投与できる。一例では、麻酔薬および血管収縮薬は、溶液中で一緒に投与される。さらに、麻酔薬および血管収縮薬は、本明細書において提供される組成物と、一緒に処方してもよく、別個に処方してもよい。単一の処方が好ましい。麻酔薬および血管収縮薬は、注射によって、浸潤によって、または局所投与によって、例えば、ゲルもしくはペーストの一部として一緒に投与できる。通常、麻酔薬および血管収縮薬は、

麻酔される部位に注射によって、例えば、皮下投与によって直接投与される。処方中の有効量は、個々の患者、治療される疾患、投与経路およびその他の検討事項に応じて変わる。このような投与量は経験的に決定できる。例えば、リドカインの例示的量は、10 mg ~ 1000 mg、100 mg ~ 500 mg、200 mg ~ 400 mg、20 mg ~ 60 mg もしくは 30 mg ~ 50 mg または約 10 mg ~ 1000 mg、100 mg ~ 500 mg、200 mg ~ 400 mg、20 mg ~ 60 mg しくは 30 mg ~ 50 mg である。投与されるリドカインの投与量は、個体および投与経路に応じて変わる。エピネフリンは、例えば、10 µg ~ 5 mg、50 µg ~ 1 mg、50 µg ~ 500 µg、50 µg ~ 250 µg、100 µg ~ 500 µg、200 µg ~ 400 µg、1 mg ~ 5 mg または 2 mg ~ 4 mg などの量で投与できる。通常、エピネフリンは、1 : 100, 000 ~ 1 : 200, 000 希釈でリドカインと組み合わせることができ、これは、100 ml の麻酔薬が 0.5 ~ 1 mg のエピネフリンを含有することを意味する。投与される容積は、治療される疾患および投与経路に応じて調整できる。容積の例示的なものとして、1 ~ 100 ml、1 ~ 50 ml、10 ~ 50 ml、10 ~ 30 ml、1 ~ 20 ml または 1 ~ 10 ml、通常、10 ~ 50 ml の麻酔薬／血管収縮薬処方が挙げられる。投与は、可溶性ヒアルロニダーゼおよび本明細書において提供されるその他の薬剤の組成物の投与の後、それと同時に、またはそれと断続的にであり得る。

10

【0326】

4. パッケージングおよび製品

パッケージング材料、ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するのに有効である医薬組成物、ならびに組成物および組合せが、ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するために使用されるべきであることを示すラベルを含有する製品も提供される。一例では、医薬組成物は、ヒアルロナン分解酵素を含有し、第2の薬剤または治療を含有しない。別の例では、製品は、ヒアルロナン分解酵素および1つまたは複数の第2の薬剤または治療を含有する。この例では、第2の薬剤および可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の医薬組成物は、製品としてのパッケージングに、一緒に提供される場合も、別個に提供される場合もある。製品の例示的なものとして、単一チャンバーおよび二重チャンバー容器をはじめとする容器がある。容器として、それだけには限らないが、試験管、ビンおよびシリンジが挙げられる。容器は、皮下投与のためのニードルをさらに含み得る。

20

【0327】

本明細書において提供される製品は、パッケージング材料を含有する。医薬製品のパッケージングにおいて使用するためのパッケージング材料は、当業者に周知である。例えば、各々、その全文が本明細書に組み込まれる米国特許第5,323,907号、同5,033,252号および同5,052,558号参照。薬剤パッケージング材料の例として、それだけには限らないが、プリスターパック、瓶、試験管、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ、瓶および選択された処方および意図される投与様式および治療に適した任意のパッケージング材料が挙げられる。任意のヒアルロナン関連疾患または状態のために種々の治療が考慮されるように、本明細書において提供される化合物および組成物の幅広い処方が考慮される。

30

【0328】

ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するのに有効な組成物（例えば、一緒にまたは別個に提供される、可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素および／または第2の薬剤もしくは治療を含有する組成物（単数または複数））もキットとして提供され得る。キットは、本明細書に記載される医薬組成物および投与のための品目を含み得る。例えば、組成物は、シリンジ、吸入器、投与量カップ、点滴器またはアプリケーションナーなどの投与のための装置を供給され得る。キットは、投与量、投与計画をはじめとする適用のための使用説明書および投与様式の使用説明書を所望により含み得る。キットはまた、本明細書に記載される医薬組成物および診断のための品目を含み得る。例えば、このようなキットは、ヒアルロナンの濃度、量または活性を測定するための品目を含み得る。

40

【0329】

50

G. 活性、バイオアベイラビリティおよび薬物動態を評価する方法

アッセイを使用して、対象が、ヒアルロナン関連疾患、状態または障害と関連しているマーカーを有し、したがって、本明細書において提供される方法を使用して治療可能であるかどうかを評価できる。このようなアッセイは、ヒアルロナンの量を測定すること、間質液圧、血管容積および水分含量を測定することを含み得る。また、アッセイを使用して、可溶性ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素の *in vitro* および *in vivo* 活性ならびに例えば、化学療法薬などのその他の薬剤の可溶性修飾されたヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の存在下および／または不在下での *in vitro* および *in vivo* 活性を評価できる。このようなアッセイの中に、PEG 化ヒアルロナン分解酵素などの修飾されたヒアルロナン分解酵素（例えば、PEG 化可溶性ヒアルロニダーゼ）と同時投与される薬剤の薬物動態特性、例えば、バイオアベイラビリティおよび耐容性を評価するものが含まれる。このようなアッセイを使用して、例えば、修飾されたヒアルロナン分解酵素、および所望により、化学療法薬などの同時投与される薬剤の、治療のための適当な投与量および投薬の頻度を決定できる。

【0330】

1. ヒアルロナン分解酵素の活性を評価するアッセイ

ヒアルロナン分解酵素の活性は、当技術分野で周知の方法を使用して評価できる。例えば、ヒアルロニダーゼの USP XXII アッセイは、酵素を HA と 37℃ で 30 分間反応させた後に残存する、分解されていないヒアルロン酸またはヒアルロナン、(HA) 基質の量を測定することによって間接的に活性を決定する (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD)。ヒアルロニダーゼ参照標準 (USP) または国民医薬品集 (National Formulary) (NF) 標準ヒアルロニダーゼ溶液を、任意のヒアルロニダーゼの、ユニットでの活性を確認するアッセイにおいて使用できる。一例では、活性は、マイクロ濁度 (*microturbidity*) アッセイを使用して測定される。これは、ヒアルロン酸が血清アルブミンと結合するときの不溶性沈殿の形成に基づく。活性は、ヒアルロニダーゼを、ヒアルロン酸ナトリウム (ヒアルロン酸) とともに一定期間 (例えば、10 分) インキュベートすること、次いで、未消化のヒアルロン酸ナトリウムを酸性化血清アルブミンの添加によって沈殿させることによって測定される。得られたサンプルの濁度を、さらなる進行期間の後、640 nm で測定する。ヒアルロン酸ナトリウム基質に対するヒアルロニダーゼ活性に起因する濁度の減少が、ヒアルロニダーゼ酵素活性の尺度である。別の例では、ヒアルロニダーゼ活性は、ヒアルロニダーゼとともにインキュベートした後に残存するビオチン化ヒアルロン酸が測定されるマイクロタイターアッセイを使用して測定される (例えば Frost and Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, 米国特許公報第 20050260186 号参照)。ヒアルロン酸のグルクロン酸残基上の遊離カルボキシル基をビオチン化し、ビオチン化されたヒアルロン酸基質を、マイクロタイタープレートに共有結合によってカップリングする。ヒアルロニダーゼとともにインキュベートした後、アビジン-ペルオキシダーゼ反応を使用して残存するビオチン化ヒアルロン酸基質を検出し、既知活性のヒアルロニダーゼ標準を用いる反応後に得られたものと比較する。ヒアルロニダーゼ活性を測定するためのその他のアッセイも当技術分野で公知であり、本明細書における方法において使用できる (例えば, Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263 参照)。

【0331】

修飾された可溶性ヒアルロニダーゼ (例えば、PEG 化 rHuPH20) などのヒアルロナン分解酵素の、展着剤または拡散剤として作用する能力も評価できる。例えば、トリパンブルー色素を、ヒアルロナン分解酵素とともに、または伴わずに、ヌードマウスの各側面の側面皮膚中に、皮下に、または皮内などで注射できる。次いで、色素領域をマイクロノギスなどを用いて測定し、ヒアルロナン分解酵素の、展着剤として作用する能力を決定する (例えば、米国公開特許番号第 20060104968 号参照)。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の、化学療法薬などの別の薬剤との同時投与の、その薬剤

の薬物動態および薬力学的特性に対する効果も、上記で論じられ、以下の実施例1において実証されるように、臨床試験の設定などにおいて、動物モデルおよび／またはヒト対象を使用して *in vivo* で評価できる。ヒアルロニダーゼではないヒアルロナン分解酵素の機能活性は、これらのアッセイのいずれかを使用してヒアルロニダーゼと比較することができる。これを行って、ヒアルロナン分解酵素の機能的に同等な量がどのようなものであるかを決定することができる。例えば、ヒアルロナン分解酵素の、展着剤または拡散剤として作用する能力は、トリパンブルーとともにマウスの側面の皮膚中にそれを注射する（例えば、皮下にまたは皮内に）ことによって評価でき、例えば、100ユニットのヒアルロニダーゼ参照標準と、同量の拡散を達成するのに必要な量を決定できる。したがって、必要なヒアルロナン分解酵素の量は、100ヒアルロニダーゼ（hyaluronidase）ユニットと機能的に同等である。修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素を用いた治療の前後での、腫瘍などにおける透水係数（K）を測定し、修飾されたヒアルロナン分解酵素調製物の活性を評価することもできる。

10

【0332】

P E G 化ヒアルロニダーゼをはじめとする修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の、上記のヒアルロナン関連疾患および障害と関連している任意の1種もしくは複数のマーカーまたはその他の関連マーカーもしくは表現型に影響を及ぼす能力は、上記の任意の1種もしくは複数のアッセイを使用して評価できる。例えば、修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の、ヒアルロナンレベルまたは含量、ハロー（halos）形成または大きさ、間質液圧、水分含量および／または血管容積を低減する能力は、*in vitro*、*ex vivo* および／または *in vivo* で上記のアッセイのうちいずれか1種または複数を使用して評価できる。一例では、修飾されたヒアルロニダーゼは、腫瘍を有する対象または適当な動物モデルに投与し、ヒアルロナンレベル、ハローの形成または大きさ、間質液圧、水分含量および／または血管容積に対する効果を評価し、修飾されたヒアルロニダーゼを投与されていない対象または動物モデルと比較することができる。いくつかの例では、修飾されたヒアルロニダーゼは、化学療法薬などの別の薬剤とともに投与できる。

20

【0333】

2. 薬物動態および耐容性

薬物動態および耐容性研究は、動物モデルを使用して実施し、または患者を用いる臨床研究の際に実施し、化学療法薬などの薬剤の特性などに対する修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素との同時投与の効果を評価できる。動物モデルとして、それだけには限らないが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、モルモットおよびカニクイザルまたはアカゲザルなどの非ヒト霊長類モデルが挙げられる。いくつかの例では、薬物動態および耐容性研究は、健常な動物を使用して実施される。その他の例では、研究は、ヒアルロナン関連疾患および障害を有するいずれかの動物モデルなどの、ヒアルロナンを用いる治療が考慮される疾患の動物モデルを使用して実施される。

30

【0334】

例えば、修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素と同時投与される化学療法薬の薬物動態特性は、投与後に、最大（ピーク）化学療法薬濃度（ C_{max} ）、ピーク時間（すなわち、最大化学療法薬濃度が生じるとき； T_{max} ）、最小化学療法薬濃度（すなわち、化学療法薬の用量間の最小濃度； C_{min} ）、消失半減期（ $T_{1/2}$ ）および曲線下面積（すなわち、時間対濃度をプロットすることによって作製した曲線下面積；AUC）などのパラメータを測定することによって評価できる。化学療法薬が皮下に投与される場合には、薬剤の絶対バイオアベイラビリティは、皮下デリバリー後の化学療法薬の曲線下面積（ AUC_{sc} ）を、静脈内デリバリー後の化学療法薬のAUC（ AUC_{iv} ）と比較することによって決定する。絶対バイオアベイラビリティ（F）は、式： $F = ([AUC]_{sc} \times 用量_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times 用量_{iv})$ を使用して算出できる。皮下投与後の血漿中の化学療法薬の濃度は、血液のサンプル中の化学療法薬の濃度を評価するのに適した当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定できる。

40

50

【0335】

薬物動態研究において、さまざまな用量および種々の投薬頻度の投薬を投与して、用量中の化学療法薬および／または修飾されたヒアルロナン分解酵素（例えば、PEG化rHuPH20）などの同時投与される薬剤の濃度を増大または減少させる効果を評価できる。バイオアベイラビリティなどの皮下投与された化学療法薬の薬物動態特性もまた、修飾されたヒアルロニダーゼの同時投与を用いて、または用いずに評価できる。例えば、ビーグルなどのイヌに、1種または複数の投与経路を使用して、化学療法薬を、修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素と組み合わせて、または単独で投与できる。このような研究を実施して、化学療法薬のバイオアベイラビリティなどの薬物動態特性に対する、ヒアルロニダーゼとの同時投与の効果を評価できる。

10

【0336】

安全性および耐容性を評価する研究も、当技術分野で公知であり、本明細書において使用できる。修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の同時投与を伴う、または伴わない、化学療法薬などの同時投与される薬剤の投与後、任意の有害反応の発生をモニタリングできる。有害反応として、それだけには限らないが、浮腫または腫脹などの注射部位反応、頭痛、発熱、疲労、悪寒、潮紅、めまい、じんま疹、喘鳴音または胸部絞扼感、悪心、嘔吐、悪寒、背痛、胸痛、筋痙攣、てんかん発作または痙攣、血圧の変化およびアナフィラキシー性または重篤な過敏症反応を挙げることができる。通常、安全性および耐容性研究では、さまざまな用量および種々の投薬頻度を投与し、用量中の化学療法薬および／または修飾されたヒアルロナン分解酵素（例えば、修飾されたヒアルロニダーゼ）の濃度を増大または減少させる効果を評価できる。

20

【0337】

3. 動物モデル

ヒアルロナン関連疾患、障害または状態の動物モデルを利用して、化学療法薬などの別の薬剤の同時投与を伴う、または伴わない、修飾されたヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素の投与の*in vivo*効果を評価できる。適当な動物モデルが利用できる例示的ヒアルロナン関連疾患として、固形腫瘍、例えば、後期癌、転移性癌、未分化癌、卵巣癌、*in situ*癌腫（ISC）、扁平上皮癌（SCC）、前立腺癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌およびその他の癌が挙げられる。また、ヒアルロナン関連疾患および障害の例示的なものとして、椎間板圧迫、癌および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷またはその他の傷害によって引き起こされる浮腫がある。

30

【0338】

動物モデルとして、それだけには限らないが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、モルモットおよびカニクイザルまたはアカゲザルなどの非ヒト霊長類モデルを挙げることができる。いくつかの例では、ヒアルロナン関連癌に由来する腫瘍細胞株を用いて、ヌードマウスまたはSCIDマウスなどの免疫不全マウスに移植し、その癌の動物モデルを確立する。ヒアルロナン関連癌に由来する例示的細胞株として、それだけには限らないが、PC3前立腺癌腫細胞、BxPC-3膵臓腺癌細胞、MDA-MB-231乳癌細胞、MCF-7乳腺腫瘍細胞、BT474乳腺腫瘍細胞、Trampt C2前立腺腫瘍細胞およびMatter-LyLu前立腺癌細胞およびヒアルロナン関連である、例えば、高レベルのヒアルロナンを含有する本明細書に記載されるその他の細胞株が挙げられる。次いで、マウスに修飾されたヒアルロニダーゼを投与し、例えば、ヒアルロナンレベルまたは含量、haloの形成または大きさ、間質液圧、水分含量および／または血管容積に対する効果を評価できる。いくつかの例では、化学療法薬を修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどの修飾されたヒアルロナン分解酵素と同時投与し、例えば、薬物動態、腫瘍の大きさまたは罹病率に対する効果を評価する。

40

【0339】

H. ヒアルロナン関連状態、疾患および障害の治療におけるヒアルロナン分解酵素の使用
本明細書に記載される方法は、ヒアルロナン分解酵素の治療的使用のための方法を含む。以下に記載される治療的使用は、例示的なものであって、本明細書に記載される方法の

50

適用を制限するものではない。

【0340】

提供される方法は、それだけには限らないが、ヒアルロナンリッチな癌ならびに間質液圧の上昇と関連しているその他の疾患、例えば、椎間板圧迫および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷またはその他の傷害によって引き起こされる浮腫またはその他の浮腫と関連している疾患などのヒアルロナンと関連しているその他の疾患ならびにその他のヒアルロナン関連疾患および状態を含めた任意のヒアルロナン関連疾患または状態を治療するためにヒアルロナン分解酵素を使用する方法を含む。

【0341】

ヒアルロナンリッチな癌として、それだけには限らないが、卵巣癌、*in situ* 癌腫（ISC）、扁平上皮癌（SCC）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌、脳癌およびその他の癌などの、間質液圧の上昇と関連している癌、固形腫瘍、後期癌、転移性癌、未分化癌が挙げられる。

【0342】

治療的使用は、癌治療、腫瘍量の減少、化学療法またはその他の癌治療に対する感受性の増大、癌治療薬またはその他の治療薬のバイオアベイラビリティまたはデリバリーの増強、間質液圧の低下、血管容積の増大、対象中の組織における水分含量の減少およびその他の治療をはじめとするヒアルロナン関連疾患または状態の治療のための、組成物の、単独またはその他の治療または薬剤と組み合わせた投与を含む。

【0343】

方法はまた、対照組織、細胞、流体またはその他のサンプル、例えば、正常な対象（例えば、ヒアルロナン関連疾患を有さない対象）由来の組織、細胞、流体などの対照、低レベルのヒアルロナンを発現すると知られているサンプル（例えば、細胞株）、例えば、本明細書に記載される例示的腫瘍細胞株、例えば、HCT116細胞株、HT29細胞株、NCIH460細胞株、DU145細胞系統、Capan-1細胞株および、このような細胞株を使用して作製した腫瘍モデル由来の腫瘍（例えば、実施例17A参照）と比較してHAの発現を調べることなどの、例えば、以下の実施例3（a）に記載される方法を使用して、例えば、ヒアルロナンまたは関連分子の発現をアッセイする方法を使用することによって、例えば、対象が、ヒアルロナン関連疾患または状態を有するかどうかを調べるための、例えば、対象の治療に先立つ、治療のための対象の選択を含む。

【0344】

この例では、対象由来のサンプルにおける、1種または複数のマーカー、例えば、ヒアルロナンまたはHAS2の発現が測定され、所望により、別のサンプルまたは標準と比較される。測定後、疾患または状態が、ヒアルロナン関連疾患または状態であるかどうかが決定的される。一例では、方法は、治療、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の、単独または1種もしくは複数その他の治療と組み合わせた投与をさらに含む。方法は、対象の細胞、組織または流体中のヒアルロナンのレベルを測定することによる治療の評価をさらに含む。

【0345】

1. ヒアルロナン関連状態および疾患

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する組成物、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼ、通常、ポリマーとのコンジュゲーションによって修飾されている可溶性ヒアルロニダーゼ（例えば、半減期を増大するために）の、単独で、または別の治療および／もしくは薬剤と組み合わせて、または別の治療および／もしくは薬剤に加えてのいずれかでの投与によって、ヒアルロナン関連疾患および状態を治療する方法が、本明細書において提供される。

【0346】

ヒアルロナン関連状態および疾患は、原因として、結果として、またはそれ以外に該疾患または状態において観察される、ヒアルロナンレベルが上昇している疾患および状態であり、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼ

10

20

30

40

50

を含有する組成物を、単独で、または別の治療および／もしくは薬剤と組み合わせた、または別の治療および／もしくは薬剤に加えてのいずれかで投与することによって治療できる。

【0347】

通常、ヒアルロナン関連疾患および状態は、組織、細胞または体液（例えば、腫瘍組織または腫瘍関連組織、血液または間質空間）における、対照、例えば、別の組織、細胞または体液と比較したヒアルロナン発現の上昇と関連している。上昇したヒアルロン発現は、正常な組織、細胞または体液、例えば、試験されているサンプルと類似しているが、正常である（すなわち、疾患または状態を有さない、または調べられている対象が有する疾患または状態の種類は有さない）対象、例えば、ヒアルロナン関連疾患または状態を有さない対象などの異なる対象から単離された組織、細胞または体液と比較して上昇したものであり得る。上昇したヒアルロナン発現は、同様の疾患または状態を有するが、その疾患が、それほど重篤ではない、および／または、ヒアルロナン関連ではない、もしくは比較的少ないヒアルロナンしか発現せず、したがって、より少ない程度にヒアルロナンに関連している別の対象由来の類似組織と比較して上昇したものであり得る。例えば、調べられている対象は、組織、細胞または流体中のHA量が、初期ステージの、分化型のまたはその他の種類の癌など、あまり重篤ではない癌を有する対象と比較して相対的に上昇している、ヒアルロナン関連癌を有する対象であり得る。別の例では、細胞、組織または流体は、既知量の、または相対量のHAを有する、流体、組織、抽出物（例えば、細胞抽出物または核抽出物）、核酸またはペプチド調製物、細胞株、生検、標準またはその他のサンプルなどの対照サンプル、例えば、低レベルのHAを発現する本明細書に記載される例示的腫瘍細胞株、例えば、HCT116細胞株、HT29細胞株、NCI H460細胞株、DU145細胞株、Capan-1細胞株およびこのような細胞株を使用して作製した腫瘍モデル由来の腫瘍などの比較的lowレベルのHAを発現することがわかっているヒト細胞株などのサンプルと比較して上昇したレベルのヒアルロナンを含有する（例えば、実施例17A参照）。

【0348】

いくつかの場合には、ヒアルロナン関連疾患および状態は、間質液圧の上昇、血管容積の減少、および／または腫瘍などの組織中の水分含量の増大と関連している。一例では、本明細書において提供される組成物および化合物を用いる治療は、これらの症状のうち1つもしくは複数または疾患または状態と関連しているその他の症状を回復させる、例えば、対象の生存または生活の質を経時的に改善し、または腫瘍成長を阻害する。

【0349】

提供された酵素、組成物および方法を使用して治療できる例示的ヒアルロナン関連疾患および状態として、それだけには限らないが、ヒアルロナンリッチな癌、例えば、後期癌、転移性癌、未分化癌、卵巣癌、*in situ*癌腫（ISC）、扁平上皮癌（SCC）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、乳癌、結腸癌およびその他の癌などの固形腫瘍をはじめとする腫瘍が挙げられる。

【0350】

また、ヒアルロナン関連疾患および状態の例示的なものとして、椎間板圧迫および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷またはその他の傷害によって引き起こされる浮腫と関連している疾患などの間質液圧の上昇と関連している疾患がある。例示的ヒアルロナン関連疾患および状態として、癌、椎間板圧迫および浮腫をはじめとする、間質液圧の上昇、血管容積の減少、および／または組織中の水分含量の増大と関連している疾患および状態が挙げられる。一例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療は、間質液圧の上昇（IFP）、血管容積の減少および組織中の水分含量の増大のうち1つまたは複数の寛解、低減またはその他の有益な効果を含む。

【0351】

通常、ヒアルロナン関連疾患または状態は、例えば、罹患組織、例えば、腫瘍におけるHA発現の増大と関連している。一例では、対象の組織において、例えば、罹患組織にお

10

20

30

40

50

いて、H A L O（ヒアルロナンを含むプロテオグリカンが豊富な細胞周囲マトリックス領域）が生じる。別の例では、対象の組織、例えば、罹患組織由来の細胞の *i n v i t r o* 培養において H A L O の存在が検出される。

【0352】

一例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害は、間質液圧の上昇、血管容積の減少または組織中の水分含量の増大と関連している。一例では、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の治療は、間質液圧の上昇（I F P）、血管容積の減少および組織中の水分含量の増大のうち1つまたは複数の回復、低減またはその他の有益な効果を含む。

【0353】

ヒアルロナンリッチな癌をはじめとする癌

ヒアルロナンは、発達、再生、修復、胚発生、胎生発育、創傷治癒、脈管形成および腫瘍形成をはじめとする細胞運動性と関連する工程において役割を果たす(Toole 1991 Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed.), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand et al. 1992 Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson et al., 1993 FASEB J. 7:1233-1241)。さらに、ヒアルロナンレベルは、腫瘍攻撃性と相関し(Ozello et al. 1960 Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi et al. 1976, Cancer Res. 36:2133-2139; Kimata et al. 1983 Cancer Res. 43:1347-1354); ヒアルロナンは、それだけには限らないが、腫瘍成長、生存、転移および間質液圧をはじめとするいくつかの癌工程を促進する。可溶性ヒアルロニダーゼを含有する提供される組成物および方法を使用して治療できるヒアルロナン関連疾患および状態の例示的なものとして、癌、特に、ヒアルロナンリッチな癌、例えば、間質液圧の上昇と関連しているヒアルロナンリッチな癌がある。

【0354】

ヒアルロナン関連癌は、ヒアルロナン発現、通常、ヒアルロナン発現の上昇と関連している癌であり、これは、以下の節に記載されるように、例えば、治療に先立って決定できる。

【0355】

例えば、ヒアルロナンリッチな癌は、実施例6Aに記載されるように、癌細胞が、*i n v i t r o* 粒子排除アッセイにおいて H A L O を生じる癌、ヒアルロナンの発現が上昇している癌（腫瘍由来の切片の免疫染色、例えば、組織学的染色によって調べられる）、H A S 2（ヒアルロナンシンターゼ2）が上昇している癌、例えば、実施例2に記載される酵素アッセイを使用して決定されるような *i n v i t r o* でヒアルロニダーゼ（H Y A L 1）を産生しない癌であり得る。ヒアルロナンリッチな癌は、ヒアルロナン発現を評価する任意の方法、例えば、以下の節3（a）に提供されるアッセイおよびタンパク質／m R N A 発現をアッセイするためのその他の公知の方法によって同定できる。

【0356】

いくつかのヒアルロナンリッチな癌が同定されている。いくつかの場合には、ヒアルロナン発現は、予後不良、例えば、生存率および／または無再発生存率の低下、転移、脈管形成、その他の組織／領域への癌細胞浸潤およびその他の予後不良の指標と相関する。このような相関は、例えば、卵巢癌、S C C、I S C、前立腺癌、非小細胞肺癌（N S C L C）を含む肺癌、乳癌、結腸癌および膵臓癌をはじめとするヒアルロナンリッチな腫瘍で観察されている（例えば、Maarit et al., Cancer Research, 60:150-155 (2000); Karvinen et al., British Journal of Dermatology, 148:86-94 (2003); Lipponen et al., Eur. Journal of Cancer, 849-856 (2001); Pirinen et al., Int. J. Cancer: 95: 12-17 (2001); Auvinen et al., American Journal of Pathology, 156(2):529-536 (2000); Ropponen et al., Cancer Research, 58: 342-347 (1998)）。したがって、ヒアルロナンリッチな癌は、癌の1種または複数の症状を治療するためのヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与によって治療できる。ヒアルロナンリッチな腫瘍として、それだけには限らないが、前立腺、乳房、結腸、卵巢、胃、頭頸部およびその他の腫瘍および癌が挙げられる。

【0357】

例えば、ヒアルロニダーゼは、腫瘍に注射されると、直接抗腫瘍形成作用を有する。ヒアルロニダーゼは、マウスに移植された腫瘍の成長を妨げ(De Maeyer et al., (1992) Int. J. Cancer 51:657-660)、発癌物質に対する曝露の際に腫瘍形成を阻害する(Pawlowski et al. (1979) Int. J. Cancer 23:105-109)。ヒアルロニダーゼは、脳癌（神経膠腫）の治療における唯一の治療薬として有効である（WO 1 9 8 8 0 2 2 6 1）。

【0358】

したがって、癌、通常、ヒアルロナン関連癌を治療するための、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する酵素、組成物および組合せが提供される。

【0359】

2. ヒアルロナン関連疾患および状態の治療における使用

ヒアルロナン関連疾患および状態を治療する方法が提供される。方法は、癌治療、腫瘍量の減少、化学療法またはその他の癌治療に対する感受性の増大、癌治療薬またはその他の治療薬のバイオアベイラビリティまたはデリバリーの増強、間質液圧の低下、血管容積の増大、対象中の組織における水分含量の減少およびその他の治療をはじめとするヒアルロナン関連疾患または状態の治療のための、組成物の、単独またはその他の治療または薬剤と組み合わせた投与を含む。

【0360】

方法はまた、例えば、以下の実施例bに記載される方法を使用して、例えば、ヒアルロナンまたは関連分子の発現をアッセイする方法を使用することによって、例えば、対象が、ヒアルロナン関連疾患または状態を有するかどうかを調べるための、例えば、対象の治療に先立つ、治療のための対象の選択を含む。この例では、対象由来のサンプルにおける、1種または複数のマーカー、例えば、ヒアルロナンまたはHAS2の発現が測定され、所望により別のサンプルまたは標準と比較される。測定後、疾患または状態が、ヒアルロナン関連疾患または状態であるかどうかが決定的される。一例では、方法は、治療、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の、単独または1種もしくは複数のその他の治療と組み合わせた投与をさらに含む。

【0361】

提供される方法の中には、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物の投与によって、ヒアルロナン関連疾患または障害、例えば、ヒアルロナン関連癌を有する対象の組織において間質液圧を低下させる方法がある。通常、IFPの低減は、例えば、24、48または72時間持続される。また、通常、例えば、少なくとも24、48または72時間以上の血管容積の持続した減少のために、組成物を投与することによって、対象の組織における血管容積を増大する方法も提供される。また、通常、効果が、例えば、少なくとも24、48または72時間以上持続される、組成物を使用して対象の組織における水分含量を低減する方法も提供される。また、組成物を使用して対象におけるヒアルロナン発現を低減して、例えば、対象の組織における細胞周囲マトリックスHALOを低減する方法も提供される。通常、低減が、投与後、少なくとも24、48、72時間以上持続される。

【0362】

a. ヒアルロナン関連疾患マーカーの検出（治療および治療効果を評価するための対象の選択）

方法は、ヒアルロナン分解酵素を用いて治療するために、および治療の有効性などの治療効果を評価するために対象を選択する工程を含む。このような方法は、ヒアルロナン関連疾患マーカーを検出する方法を含み、これは、対象がヒアルロナン関連疾患を有するという、対象がヒアルロナン分解酵素による治療に応じる可能性が高いという、および／または組織、細胞または流体などの対象由来のサンプルが、ヒアルロナン発現の上昇を含むという任意の指標を含む。マーカーを検出するための例示的アッセイは、以下に記載されており、対象由来のサンプル中のHA発現および／または関連HA発現を測定するアッセイ、対象由来のサンプルに対するヒアルロナン分解酵素の効果を分析するアッセイおよび通常、低いヒアルロニダーゼ発現または活性、高い間質液圧、血管容積および水分含量な

10

20

30

40

50

ど、特定のヒアルロナン関連疾患／状態と関連している読み取り情報を測定するアッセイを含む。一般に、対象由来のサンプル中のタンパク質または核酸を検出するための、また *in vitro* で細胞／組織に対する治療の効果を評価するための任意の既知アッセイを使用できる。

【0363】

本明細書において提供される方法における治療のために選択される対象として、疾患または状態を有さない対象と比較して、または上昇した、異常な、もしくは蓄積したHAの発現を有していない正常な組織もしくはサンプルと比較して、上昇した、異常な、もしくは蓄積したヒアルロナンの発現を有する対象が挙げられる。対象由来の任意のサンプルまたは組織を、試験し、正常なサンプルまたは組織と比較できる。ヒアルロナンレベルは、組織（例えば、生検によって）腫瘍、細胞から、または血液、血清、尿もしくはその他の体液からなど任意の供給源から測定できる。例えば、本明細書において別の場所で記載されるように、固形腫瘍におけるHA沈着のプロフィールは、通常、細胞周囲または間質として分類されている。HAの上昇した血漿レベルは、ウィルムス腫瘍、中皮腫および肝臓転移を有する患者において最も顕著に観察されている。したがって、疾患または状態に応じて、ヒアルロナンレベルについて種々のサンプルを測定できる。サンプルの選択は、当業者のレベルの範囲内である。

【0364】

ヒアルロニダーゼ基質レベルを測定するために使用されるアッセイは、疾患または状態の関数であり、特定の疾患または状態に基づいて選択できる。当業者は、ヒアルロナンを検出する方法に精通しており、これとして、それだけには限らないが、以下の節(i)に記載される免疫組織化学法、ELISA法が挙げられる。

【0365】

一例では、マーカーを検出する工程は、対象が、ヒアルロナン分解酵素を用いる治療に適しているヒアルロナン関連状態または疾患を有するかどうかを調べるために、対象の治療に先立って実施する。この例では、マーカーが検出される場合には（例えば、患者由来の細胞、組織または流体が、上昇したヒアルロナン発現を含有する、またはヒアルロナン分解酵素に対して応答性であると決定される場合）、対象にヒアルロナン分解酵素が投与される治療工程が実施される。一例では、マーカーが検出されない場合には（例えば、患者由来の細胞、組織または流体が、正常な、もしくは上昇していないヒアルロナン発現を含有する、またはヒアルロナン分解酵素に対して応答性ではないと決定される場合）、別の治療選択肢を選択できる。

【0366】

別の例では、マーカーを検出する工程は、例えば、ヒアルロナン分解酵素を用いる治療が疾患または状態の治療に対して効果を有するかどうかを調べるために、対象を治療した後に、または対象の治療の過程の間に（例えば、ヒアルロナン分解酵素（例えば、可溶性の修飾されたヒアルロニダーゼ）を用いる治療（同時投与される薬剤を伴う、または伴わない））実施される。このような一例では、マーカーは検出されない、または治療前の量／レベルと比較して、または別のサンプルと比較して減少している量もしくは相対レベルで検出されるか、または治療が継続され、もう1ラウンド治療が実施され、または併用療法などの別の治療が開始される。別のこのような例では、マーカーが治療前または別のサンプルと同じレベルで検出される場合には、別の治療選択肢を選択してもよい。

【0367】

i. ヒアルロナン関連疾患マーカーを検出するためのアッセイ

ヒアルロナン関連疾患および状態のマーカーを検出するアッセイは、対象の組織、細胞および／または体液、例えば、腫瘍におけるヒアルロナンおよび／またはヒアルロニダーゼ発現の量（例えば、相対量）を測定するアッセイを含む。このようなアッセイの中に、HA発現、ヒアルロナンシンターゼ2（HAS2）発現、HALO（ヒアルロナンをはじめとするプロテオグリカンの豊富な細胞周囲マトリックス領域）の存在および対象由来のサンプル中のヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の存在を検出できるものが含

まれる。

【0368】

タンパク質および核酸レベルを検出するアッセイは、当技術分野で周知であり、本明細書における方法において使用して、ヒアルロナン、ヒアルロナンシンターゼまたはその他のタンパク質および／または核酸発現を測定できる。このようなアッセイとして、それだけには限らないが、ELISA、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、PCR、RT-PCR、免疫組織化学、組織診断およびフローサイトメトリーが挙げられる。例えば、組織サンプル（例えば、患者または動物モデル由来の腫瘍の生検、間質サンプル）、流体（例えば、血液、尿、血漿、唾液もしくはその他のサンプル）、細胞または細胞性サンプルまたは抽出物またはその他のサンプルなどの対象由来のサンプルを、例えば、組織またはサンプル中のヒアルロナンの存在および程度を調べるための、固定または凍結された組織切片の免疫組織化学（IHC）などの組織学的染色（例えば、実施例8．B．2．参照）、または免疫蛍光細胞染色、プルダウンアッセイおよびフローサイトメトリーを使用し、抗HA抗体を用いて染色することができる。別の例では、サンプル、例えば、生検をRT-PCRによってアッセイし、HA mRNAの量を評価することができる。

10

【0369】

癌においてヒアルロナン発現を検出するための既知方法として、それだけには限らないが、膀胱癌を有する対象の尿または膀胱組織抽出物中のHAレベルを測定するための、Lokeshwar et al., Cancer Res. 57: 773-777 (1997)に記載されるELISA様アッセイが挙げられる。アッセイのために、尿または抽出物をマイクロウェルプレート上にコーティングし（標準として使用される臍帯HAもコーティングされる）、続いて、本明細書に記載されるものなどの標識された（例えば、ビオチン化）HA結合タンパク質とともにインキュベートし（例えば、16時間、室温）、洗浄し、アビジン-ビオチン検出物質基質を使用してウェルと結合しているHA結合タンパク質を定量する。このような方法は、当技術分野で周知である。一例では、HA関連膀胱癌を有する対象由来の尿は、正常な患者（健常な対象またはその他の胃泌尿器疾患または状態を有する対象）由来の尿／抽出物と比較して、2～9倍上昇しているHAレベルを含有しており；従って、マーカーは、尿中のHAレベルが、正常な対象と比較して上昇している、例えば、2倍または約2倍から9倍または約9倍の間で上昇している、例えば、正常な対象と比較して2、3、4、5、6、7、8もしくは9倍または約2、3、4、5、6、7、8もしくは9倍の上昇の場合に検出される。

20

30

【0370】

さらなる例では、腫瘍細胞におけるヒアルロナン発現および産生を、上記の方法のいずれか1種を使用してin vitroで評価できる。同様に、in vitro、ex vivoまたはin vivoでの細胞によるヒアルロナンシンターゼ2（HAS2）産生および／または発現もまた、例えば、ELISA、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、PCR、RT-PCR、免疫組織化学、組織診断またはフローサイトメトリーによってアッセイできる。

【0371】

別の例では、濁度アッセイを用いてなど、実施例2に記載されるように、血液または血漿中などの、対象由来のサンプル中のヒアルロニダーゼ活性の量が調べられる。

40

【0372】

別の例では、患者由来の細胞またはその他の組織は、単離された、例えば、腫瘍細胞であり、例えば、治療に応じた、腫瘍細胞などの細胞または組織の成長、増殖および／または生存を測定するためのクローン原性アッセイまたは任意のその他のアッセイを使用して、in vitroで細胞または組織が、ヒアルロナン分解酵素を用いる治療に対して応答性であるかどうかを調べるための研究において使用される。一例では、対象由来の癌細胞を、商標名Matrigel（登録商標）（BD Biosciences）のもとで販売される混合物などの細胞外マトリックスまたはタンパク質混合物などの表面に播種することによる、下記実施例7Dに記載されるような研究がある。この例では、ヒアルロナ

50

ン関連マーカーは、ヒアルロナン分解酵素の投与に対する細胞または組織の感受性である。この例では、ヒアルロナン分解酵素の添加によって細胞の増殖、成長または生存などの任意の特性が阻害または阻止される場合には、対象は、ヒアルロナン分解酵素を含有する組成物を用いる治療に適している可能性があるとして決定される。

【0373】

ヒアルロナン発現レベルを調べるアッセイに加えて、その他のアッセイを使用して、治療のための対象を選択できる、ならびに／または治療有効性および／もしくは期間を評価できる。間質液圧（IFP）は、適当なプローブまたは機器を使用して測定できる。例えば、トランスデューサーが先端についたカテーテルを使用して、注目する癌組織またはその他の組織におけるIFPを測定できる。カテーテルは、手術用針の内側の穴を通して通され、これが、次いで、腫瘍の中心に挿入される。 Needle が引き抜かれ、カテーテルは適切な位置に保持される。次いで、IFP（mmHg）を、適当なデータ獲得ユニットを使用して測定できる（例えば、実施例6B、Ozerdem et al. (2005) Microvasc. Res. 70:116-120参照）。IFPを測定するためのその他の方法として、ウィックイン Needle (wick-in-needle) 法 (Fadnes et al (1977) Microvasc. Res. 14:27-36) が挙げられる。

10

【0374】

血管容積は、例えば、以下の実施例10に記載されるような超音波画像診断によって測定できる。この方法は、検出される強い超音波反射を提供するようハイパーエコーを示すマイクロバブルを用いる。マイクロバブルは、対象または動物モデルに静脈内になどで注入されると、その大きさのために血管内に捕捉されるようになる。腫瘍組織水分含量などの組織水分含量を評価するアッセイもまた、当技術分野で公知である。例えば、腫瘍からサンプルを採取し、吸い取り、秤量し、スナップ凍結し、その後、凍結乾燥できる。次いで、水重量は、組織湿潤重量対乾燥（すなわち、凍結乾燥）重量比として報告される。

20

【0375】

腫瘍細胞の、*in vitro*で細胞周囲マトリックス（halo）を形成する能力は、粒子排除アッセイ（例えば、実施例6参照）を使用して評価できる。小さい粒子（ホルマリン固定された赤血球）を、例えば、大きな凝集性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるアグリカンの存在下で腫瘍細胞の低密度培養物に加えることができる。粒子が落ち着いた後、400×の倍率で培養物を視察して、腫瘍細胞によって何らかのhaloが形成されたかどうかを決定することができる。これは、粒子が排除されている細胞周囲の領域として可視化され得る。

30

【0376】

i i. 対照サンプルと比較したヒアルロナン関連マーカーの検出

いずれの検出方法についても、マーカー（例えば、HA発現、ヒアルロナン分解酵素に対する応答性、HAシンターゼ発現またはヒアルロニダーゼ活性）は、通常、対照サンプルと比較され、その結果、マーカーの検出は、通常、読み取り情報が、対照サンプルと比較して上昇または低減していると決定することを含む。

【0377】

例えば、対照サンプルは、正常な組織、細胞または体液、例えば、調べられているサンプルと類似しているが、正常である（すなわち、疾患または状態を有さない、または調べられている対象が有する疾患または状態の種類は有さない）対象、例えば、ヒアルロナン関連疾患または状態を有さない対象などの異なる対象から単離された、組織、細胞または体液などの、別の組織、細胞または体液、あるいは、同様の疾患または状態を有するが、その疾患がそれほど重篤ではない、および／または、ヒアルロナン関連ではない、もしくは、比較的少ないヒアルロナンしか発現せず、したがって、より少ない程度にヒアルロナンに関連している別の対象由来の類似の組織であり得る。例えば、調べられている細胞、組織または流体が、癌を有する対象である場合には、初期ステージの、分化型のまたはその他の種類の癌など、あまり重篤ではない癌を有する対象由来の組織、細胞または流体と比較することができる。別の例では、対照サンプルは、既知量の、または相対量のHAを有する、流体、組織、抽出物（例えば、細胞抽出物または核抽出物）、核酸またはペプチ

40

50

ド調製物、細胞株、生検、標準またはその他のサンプル、例えば、比較的低レベルのH Aを発現すると知られているサンプル、例えば、腫瘍細胞株、例えば、低レベルのH Aを発現する本明細書に記載される例示的腫瘍細胞株、例えば、H C T 1 1 6細胞株、H T 2 9細胞株、N C I H 4 6 0細胞株、D U 1 4 5細胞株、C a p a n - 1細胞株およびこのような細胞株を使用して作製した腫瘍モデル由来の腫瘍である（例えば、実施例1 7 A参照）。

【0 3 7 8】

特定の変化、例えば、H Aの増大または減少は、使用されるアッセイに応じて変わることとは理解される。例えば、E L I S Aでは、特定の波長での吸光度の、またはタンパク質の量（例えば、標準曲線を使用することによって決定される）の増加または減少倍率は、対照に対して表すことができる。R T - P C RなどのP C Rアッセイでは、標準を使用するなど、当業者に公知の方法を使用して、対照発現レベルと比較する（例えば、変化倍数として表す）ことができる。

【0 3 7 9】

例えば、対象由来のサンプル中のヒアルロナンの量が調べられている場合には、マーカーの検出は、対象由来のサンプル（例えば、癌性細胞、組織または流体）中のH Aの量が、先の段落において記載された対照サンプルなどの対照サンプルと比較して上昇しているということを決断するものであり得る。一例では、癌は、組織、細胞または流体中のH Aの量が、例えば、それだけには限らないが、既知量の、または相対量のH Aを有する、流体、組織、抽出物（例えば、細胞抽出物または核抽出物）、核酸またはペプチド調製物、細胞株、生検、標準またはその他のサンプル、例えば、比較的低レベルのH Aを発現すると知られているサンプル、例えば、腫瘍細胞株、例えば、低レベルのH Aを発現すると本明細書に記載される例示的腫瘍細胞株、例えば、H C T 1 1 6細胞株、H T 2 9細胞株、N C I H 4 6 0細胞株、D U 1 4 5細胞株、C a p a n - 1細胞株およびこのような細胞株を使用して作製した腫瘍モデル由来の腫瘍（例えば、実施例1 7 A参照）であり得る対照サンプルと比較して、0. 5倍、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍もしくはそれ以上、または約0. 5倍、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍もしくはそれ以上上昇している場合に、ヒアルロナンリッチな癌であると決定される。

【0 3 8 0】

例えば、本明細書における目的上、ヒアルロナンリッチな腫瘍を有する患者を、ヒアルロニダーゼを、単独または第2の薬剤と組み合わせて用いる治療のために選択できる。このような例では、腫瘍は直接生検し、H Aの発現について染色することができる。その他の例では、血液または尿サンプルまたは特定の腫瘍に関連しているその他の体液サンプルなどのサンプルをH Aについてアッセイできる。アッセイの種類は、腫瘍の種類に応じて変わるが、2種以上のアッセイを使用してH Aを検出してもよいということが考慮される。特定の腫瘍のための本明細書におけるこのようなアッセイに対する言及は、単に例示のためのものである。例えば、膀胱癌については、標準E L I S A手順によってヒアルロナンについて尿サンプルをアッセイできる。本明細書における目的上、正常な患者対照由来の尿と比較して1. 5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上のH Aを示す対象（例えば、L o k e s h w a r e t a l . (2 0 0 0) J . U r o l . , 1 6 3 : 3 4 8 - 5 6 参照）を選択できる。別の例では、腫瘍細胞を生検し、免疫組織化学などによってH Aについて染色できる（例えば、Anttila et al. (2000) Cancer Research, 60:150-156; Karvinen et al. (2003) British J of Dermatology, 148:86-94; Lipponen et al. (2001) Euro J Can. 37: 849-856; Auvinen et al. (2000) American J of Pathology, 156:529; 参照）。通常、このような例では、腫瘍サンプルまたは腫瘍細胞は、任意の癌細胞と結合しているH Aシグナルが観察される場合に、H Aについて陽性と考えられる。バックグラウンド染色のための陰性対照として、細胞をヒアルロニダーゼで予備消化して、すべての細胞と結合しているH Aを切断することが

できる。サンプルはまた、同一対象由来の正常な細胞または組織と比較することができる。さらに、このような方法では、細胞と結合しているヒアルロنانのレベルは、低、中または高としてスコア化することができる。例えば、H A 発現は、30%、35%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれ以上の腫瘍領域が、持続性H A シグナルを示した場合に、高または中と考えられる。通常、中から高H A を有する対象の治療が本明細書において考慮される。

【0381】

b. 癌の治療における使用

上記で示されるように、ヒアルロナンは、癌に関連している過程において役割を果たし、ヒアルロナンレベルは、腫瘍攻撃性ならびに腫瘍攻撃性および予後不良の種々のマーカーと相関する。したがって、ヒアルロナン関連癌を、ヒアルロナン分解酵素ならびにヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を含有する組成物および組合せを用いて治療する方法が提供される。癌として、ヒアルロナンリッチな癌および間質液圧の上昇と関連している癌が挙げられる。

【0382】

ヒアルロナン関連癌とは、ヒアルロナン発現、通常、ヒアルロナン発現の上昇と関連している癌である。一例では、サンプル、例えば、細胞サンプル、組織、腫瘍間質、血漿、血液または癌を有する対象由来のその他のサンプルにおいて、ヒアルロنانの発現が上昇している、例えば、非罹患組織、細胞、間質、血漿、血液またはその他のサンプル由来の、またはあまり重篤ではない癌、例えば、初期ステージの、分化型のまたはその他の種類の癌由来のサンプルと比較して上昇した発現。ヒアルロنانのレベルは、組織学的方法またはポリペプチドまたはmRNAの発現を評価するためのその他の公知の方法によって、例えば、上記の節3(a)において、例えば、上記のように、対象の治療に先立って決定できる。

【0383】

一例では、ヒアルロナン分解酵素（例えば、ヒアルロニダーゼ）は、例えば、静脈内に（IV）、筋肉内に、または任意の別の全身経路によって全身投与される。別の例では、ヒアルロナン分解酵素組成物は、局所的に（local ly）、例えば、腫瘍内に投与される。

【0384】

治療方法として、ヒアルロナン分解酵素の反復投与、例えば、毎時間、数時間毎、1日に3回、1日に2回、1日に1回、1日おき、3日に1回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、月に1回の投与またはその他の反復投与が挙げられ、一定期間にわたって連続投与する方法も挙げられる。

【0385】

一例では、ヒアルロナン関連癌の治療は、ヒアルロナン依存的に間質液圧を低下させることを含む。例えば、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の静脈内投与、特に、修飾された可溶性ヒアルロニダーゼ（例えば、PEG化rHuPH20）の投与は、ヒアルロナンリッチなヒト癌腫異種移植片モデル（PC3）では、上昇した間質液圧を低下させるが、ヒアルロナン欠乏のヒト癌腫異種移植片モデル（NCIH460）では低下させない（以下の実施例6および8~9を参照）。以下の例において示されるように、間質液圧は、ヒアルロナンリッチな動物モデルにおいて腫瘍の大きさと相関する。したがって、可溶性ヒアルロニダーゼ、通常、ポリマーとコンジュゲートしているヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を投与し（例えば、静脈内投与をはじめとする全身投与によって）、それによって、ヒアルロナン関連癌を有する対象において、上昇した間質液圧を低下させることによって癌を治療する方法が、本明細書において提供される。

【0386】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を用いる治療はまた、例えば、ヒアルロニダーゼを静脈内投与することによって、血管容積を増大させることおよび／または腫瘍中の水分含量を低減することを含み得る。

【0387】

ヒアルロニダーゼ単独などのヒアルロナン分解酵素単独での疾患の治療に加えて、ヒアルロナン分解酵素を、化学療法薬またはその他の抗癌剤または治療と組み合わせて、例えば、同時に、またはそれに先立って投与することによって、本明細書において提供される組成物および方法を使用してまた、ヒアルロナン関連癌を治療できる。この例では、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、通常、化学療法薬またはその他の抗癌剤の、固形腫瘍への浸透を増強し、それによって、疾患を治療する。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、抗癌剤とともに、腫瘍内に注射してもよく、または播種性癌または到達しづらい腫瘍には静脈内に注射してもよい。

【0388】

抗癌剤およびその他の治療

抗癌剤は、化学療法薬、抗体、ペプチドまたは遺伝子療法ベクター、ウイルスまたはDNAであり得る。さらに、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を使用して、多剤耐性を獲得しているこれまでは化学療法抵抗性であった腫瘍における感作のために、腫瘍細胞を循環プールに動員できる(St Croix et al., (1998) Cancer Lett September 131 (1): 35-44)。例えば、rHuPH20などのヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素はまた、モノクローナル抗体、サイトカインなどの生物製剤およびその他の薬剤の、グリコサミノグリカン蓄積する腫瘍へのデリバリーを増強し得る。

【0389】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与の後に、それと一緒にまたはその前に投与できる例示的抗癌剤として、それだけには限らないが、アシピシン；アクラルピシン；アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アレムツズマブ；アリトレチノイン（9-Cis-レチノイン酸）；アロプリノール；アルトレタミン；アルボシジブ；アンバゾン；アンボマイシン；アメタントロン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アナキシロン；アンシタビン；アントラマイシン；アバジコン；アルギメスナ；ヒ素三酸化物；アスバラギナーゼ；アスペルリン；アトリムスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；パノキサントロン；パタプリン；パチマスタット；生BCG；ベナキシピン；ベンダムスチン；ベンゾデパ；ベキサロテン；ベバシズマブ；ビカルタミド；ビエタセルピン；ビリコダル；ビスアントレン；ビスアントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブレキナル；プロピリミン；ブドチタン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カネルチニブ；カペシタビン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；ポリフェプロザンを伴うカルムスチン；カルムスチン；カルピシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；セレコキシブ；セマドチン；クロラムブシル；シオテロネル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリビン；クランフェヌル；クロファラビン；クリスナトール；シクロホスファミド；リボソーム型シタラビン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダルベポエチン α ；リボソーム型ダウノルビシン；ダウノルビシン／ダウノマイシン；ダウノルビシン；デシタビン；デニロイキンジフチトクス；デクスニグルジピン；デキソナプラチン；デクスラゾキサラン；デザグアニン；ジアジコン；ジブロスピジウム；ジエノゲスト；ジナリン；ジセルモリド；ドセタキセル；ドフェキダル；ドキシフルリジン；リボソーム型ドキソルビシン；ドキソルビシンHCL；ドコルピシンHCLリボソーム注射剤；ドキソルビシン；ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エコムスチン；エダトレキサート；エドテカリン；エフロールニチン；エラクリダル；エリナフィド；エリオットB溶液；エルサミトルシン；エミテフル；エンロプラチン；エンプロメート；エンザスタウリン；エピプロピジン；エピルビシン；エポエチン α ；エプタロプロスト；エルプロゾール；エソルビシン；エストラムスチン；エタニダゾール；エトグルシド；リン酸エトポシド；エトポシドVP-16；エトポシド；エトプリン；エキセメスタン；エクシスリンド；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フロクスウリジン；フルダラビン；フルオロウラシル；5-フルオロウラシル；フルオキシメステロン；フルロシタビン；ホス

10

20

30

40

50

キドン；ホストリエシン；ホストリエシン；ホトレタミン；フルベストラント；ガラルビ
 シン；ガロシタピン；ゲムシタピン；ゲムツズマブ／オゾガマイシン；ゲロキノール；ギ
 マテカン；ギメラシル；グロキサゾン；グルホスファミド；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシ
 尿素；イブリツモマブ／チウキセタン；イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；
 イロマスタット；メシル酸イマチニブ；イメキソン；インプロスルファン；インジスラム
 ；インプロコン；インターフェロン α 2 a；インターフェロン α 2 b；インターフェロン
 α ；インターフェロン β ；インターフェロン γ ；インターフェロン；インターロイキン 2
 および他のインターロイキン（組換えインターロイキンを含む）；イントプリシン；ヨー
 ベングアン [1 3 1－I]；イプロプラチン；イリノテカン；イルソグラジン；イクサベ
 ピロン；ケトトレキサート；L－アラノシン；ランレオチド；ラパチニブ；レドキサント
 ロン；レトロゾール；ロイコボリン；リユープロリド；リユープロレリン（リユープロレ
 リド）；レバミソール；レキサカルシトール；リアロゾール；ロバプラチン；ロメトレキ
 ソール；ロムスチン／CCNU；ロムスチン；ロナファルニブ；ロソキサントロン；ルル
 トテカン；マホスファミド；マンノスルファン；マリマスタット；マソプロコール；メイ
 タンシン；メクロレタミン；メクロレタミン／ナイトロジェンマスタード；酢酸メゲスト
 ロール；メゲストロール；メレンゲストロール；メルファラン；メルファラン I L－P A
 M；メノガリル；メピチオスタン；メルカプトプリン；6－メルカプトプリン；メスナ；
 メテシンド；メトトレキサート；メトキサレン；メトミダート；メトプリン；メツレデパ
 ；ミボプラチン；ミプロキシフェン；ミソニダゾール；ミチンドミド；ミトカルシン；ミ
 トクロミン；ミトフラキソン；ミトギリ；ミトグアゾン；ミトマルシン；マイトマイシ
 ン C；マイトマイシン；ミトナフィド；ミトキドン；ミトスペル；ミトタン；ミトキサン
 トロン；ミトゾロミド；ミボプリン；ミゾリビン；モファロテン；モピダモール；ムブリ
 チニブ；ミコフェノール酸；フェンプロピオン酸ナンドロロン；ネダプラチン；ネルザラ
 ビン；ネモルビシン；ニトラクリン；ノコダゾール；ノフェツモバブ；ノガラマイシン；
 ノラトレキセド；ノルトピキサントロン；オクトレオチド；オブレレベキン；オルマプラ
 チン；オルタタキセル；オテラシル；オキサリプラチン；オキシスラン；オキシフェナル
 シン；パクリタキセル；パミドロネート；パツピロン；ペガデマーゼ；ペガスパルガーゼ
 ；ペグフィルグラスチム；ペルデシン；ペリオマイシン；ペリトレキサール；ペメトレキ
 セド；ペンタムスチン；ペントスタチン；ペプロマイシン；ペルホスファミド；ペリホシ
 ン；ピコプラチン；ピナフィド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピルフェニドン；ピロ
 キサントロン；ピキサントロン；プレビトレキセド；プリカミシドミトラマイシン；プリ
 カマイシン；プロメスタン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィマー；ポ
 ルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロカルバジン；プロバミジン；プロスピジウム
 ；プミテパ；ピューロマイシン；ピラゾフリン；キナクリン；ラニムスチン；ラスブリカ
 ーゼ；リボプリン；リトロスルファン；リツキシマブ；ログレチミド；ロキニメックス；
 ルホクロモマイシン；サバルビシン；サフィンゴール；サルグラモスチム；サトラプラチ
 ン；セブリプラチン；セムスチン；シムトラゼン；シゾフィラン；ソブゾキサン；ソラフ
 ェニブ；スパルホサート；スパルホス酸；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム；スピ
 ロムスチン；スピロプラチン；スピロプラチン；スクアラミン；ストレプトニグリン；ス
 トレプトバリシン；ストレプトゾシン；スホスファミド；スロフェヌル；リンゴ酸スニチ
 ニブ；6－チオグアニン（6－TG）；タセジナリン；タルク；タリソマイシン；タリム
 スチン；タモキシフェン；タリキダール；タウロムスチン；テコガラン；テガフル；テ
 ロキサントロン；テモボルフィン；テモゾロミド；テニボシド／VM－2 6；テニボシド
 ；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアミプリ
 ン；チアゾフリン；チロミソール；チロロン；チムコダル；チモナシク；チラパザミン
 ；トピキサントロン；トポテカン；トレミフェン；トシツモマブ；トラベクトジン（エク
 チナサイジン 7 4 3）；トラスツズマブ；トレストロン；トレチノイン／ATRA；トリ
 シリピン；トリロスタン；トリメトレキセート；四硝酸トリプラチン；トリプトレリン；
 トロホスファミド；ツプロゾール；ウベニメクス；ウラシルマスタード；ウレデパ；バル
 ルビシン；バルスポダル；バプレオチド；ベルテボルフィン；ビンブラスチン；ビンクリ

10

20

30

40

50

スチン；ビンデシン；ビネピジン；ビンフルニン；ビンホルミド；ピングリシネート；ビンロイシノール；ビンロイロシン；ビノレルビン；ビンロシジン；ビントリプトール；ビンゾリジン；ボロゾール；キサントマイシンA（グアメシクリン）；ゼニプラチン；ジラスコルブ〔2-H〕；ジノスタチン；ゾレドロネート；ゾルピシン；およびゾスキダル例えば、

アルデスロイキン（例えば、PROLEUKIN（登録商標））；アテムツズマブ（例えば、CAMPATH（登録商標））；アリトレチノイン（例えば、PANRETIN（登録商標））；アロプリノール（例えば、ZYLOPRIM（登録商標））；アルトレタミン（例えば、HEXALEN（登録商標））；アミホスチン（例えば、ETHYOL（登録商標））；アナストロゾール（例えば、ARIMIDEX（登録商標））；三酸化ヒ素（例えば、TRISENOX（登録商標））；アスパラギナーゼ（例えば、ELSPAR（登録商標））；BCG Live（例えば、TICE（登録商標）BCG）；ベキサロテン（例えば、TARGRETIN（登録商標））；ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標））；ブレオマイシン（例えば、BLENOXANE（登録商標））；ブスルファン静脈内（例えば、BUSULFEX（登録商標））；ブスルファン経口（例えば、ミレラン（登録商標））；カルステロン（例えば、METHOSARB（登録商標））；カペシタビン（例えば、ゼローダ（登録商標））；カルボプラチン（例えば、パラプラチン（登録商標））；カルムスチン（例えば、BCNU（登録商標）、BiCNU（登録商標））；ポリフェプロサン（Polifeprosans）を伴うカルムスチン（例えば、GLIADEL（登録商標）ウエハー）；セレコキシブ（例えば、CELEBREX（登録商標））；クロラムブシル（例えば、LEUKERAN（登録商標））；シスプラチン（例えば、PLATINOL（登録商標））；クラドリビン（例えば、LEUSTATIN（登録商標）、2-CdA（登録商標））；シクロホスファミド（例えば、CYTOXAN（登録商標）、NEOSAR（登録商標））；シタラビン（例えば、CYTOSAR-U（登録商標））；シタラビンリポソーム（例えば、DepoCyt（登録商標））；ダカルバジン（例えば、DTIC-Dome）；ダクチノマイシン（例えば、COSMEGEN（登録商標））；ダルベポエチンアルファ（例えば、ARANESP（登録商標））；ダウノルビシンリポソーム（例えば、DANUOXOME（登録商標））；ダウノルビシン／ダウノマイシン（例えば、CERUBIDINE（登録商標））；デニロイキンジフチトクス（例えば、ONTAK（登録商標））；デクスラゾキササン（例えば、ZINECARD（登録商標））；ドセタキセル（例えば、タキソテール（登録商標））；ドキソルビシン（例えば、アドリアマイシン（登録商標）、RUBEX（登録商標））；ドコルビシン（Docorubicin）HCLリポソーム注射剤をはじめとするドキソルビシンリポソーム（例えば、ドキシル（登録商標））；プロピオン酸ドロモスタノロン（例えば、DROMOSTANOLONE（登録商標）およびMASTERONE（登録商標）注射剤）；エリオットB溶液（Elliott's B solution）（例えば、Elliott's B Solution（登録商標））；エピルビシン（例えば、ELLENCE（登録商標））；エポエチンアルファ（例えば、EPOGEN（登録商標））；エストラムスチン（例えば、EMCYT（登録商標））；リン酸エトポシド（例えば、ETOPOPHOS（登録商標））；エトポシドVP-16（例えば、ベプシド（登録商標））；エキセメスタン（例えば、アロマシン（登録商標））；フィルグラスチム（例えば、NEUPOGEN（登録商標））；フロクスウリジン（例えば、FUDR（登録商標））；フルダラビン（例えば、フルダラ（登録商標））；フルオロウラシルを含む5-FU（例えば、ADRUCIL（登録商標））；フルベストラント（例えば、FASLODEX（登録商標））；ゲムシタビン（例えば、ジェムザール（登録商標））；ゲムツズマブ／オゾガマイシン（例えば、MYLOTARG（登録商標））；酢酸ゴセレリン（例えば、ZOLADEX（登録商標））；ヒドロキシ尿素（例えば、ハイドレア（登録商標））；イブリツモマブ／チウキセタン（例えば、ZEVALLIN（登録商標））；イダルビシン（例えば、IDAMYCIN（登録商標））；イホスファミド（例えば、IFEX（登録商標））；メシル酸イマチニブ（例えば、GLEEVEC（登録商標））；イン

10

20

30

40

50

ターフェロンアルファ-2a s (例えば、ROFERON-A (登録商標)) ; インターフェロンアルファ-2b s (例えば、INTRON A (登録商標)) ; イリノテカン (例えば、CAMPTOSAR (登録商標)) ; レトロゾール (例えば、FEMARA (登録商標)) ; ロイコボリン (例えば、WELLCOVORIN (登録商標))、LEUCOVORIN (登録商標)) ; レバミソール (例えば、ERGAMISOL (登録商標)) ; ロムスチン/CCNU (例えば、CeeBU (登録商標)) ; メクロレタミン/ナイトロジェンマスタード (例えば、MUSTARGEN (登録商標)) ; 酢酸メゲストロール (例えば、MEGACE (登録商標)) ; メルファラン/L-PAM (例えば、ALKERAN (登録商標)) ; 6-メルカプトプリン (6-MPs ; 例えば、PURINETHOL (登録商標)) をはじめとするメルカプトプリン ; メスナ (例えば、MESNEX (登録商標)) ; メトトレキサート ; メトキサレン (例えば、UVADEX (登録商標)) ; マイトマイシン C (例えば、MUTAMYCIN (登録商標))、MITOZYTR EX (登録商標)) ; ミトタン (例えば、LYSODREN (登録商標)) ; ミトキサントロン (例えば、NOVANTRONE (登録商標)) ; フェンプロピオン酸ナンドロロン (例えば、DURABOLIN-50 (登録商標)) ; ノフェツモマブ (Nofetumomabs) (例えば、VERLUMA (登録商標)) ; オブレルベキン (例えば、NEUMEGA (登録商標)) ; オキサリプラチン (例えば、エロキサチン (登録商標)) ; パクリタキセル (例えば、PAXENE (登録商標))、TAXOL (登録商標)) ; パミドロン酸 (例えば、AREDIA (登録商標)) ; ペガデマーゼ (例えば、ADAGEN (登録商標)) ; ペグアスパルガーゼ (例えば、ONCASPARGAR (登録商標)) ; ペグフィルグラスチム (例えば、NEULASTA (登録商標)) ; ペントスタチン (例えば、NIPENT (登録商標)) ; ピボプロマン (例えば、VERCYTE (登録商標)) ; プリカマイシン/ミトラマイシン (例えば、MITHRACIN (登録商標)) ; ポルフィマーナトリウム (例えば、フォトフリン (登録商標)) ; プロカルバジン (例えば、MATULANE (登録商標)) ; キナクリン (例えば、ATABRINE (登録商標)) ; ラスブリカーゼ (例えば、ELITEK (登録商標)) ; リツキシマブ (例えば、RITUXAN (登録商標)) ; サルグラモスチム (例えば、PROKINE (登録商標)) ; ストレプトゾシン (例えば、ZANOSAR (登録商標)) ; リンゴ酸スニチニブ (例えば、SUTENT (登録商標)) ; タルク (例えば、SCLEROSOL (登録商標)) ; タモキシフェン (例えば、ノルバデックス (登録商標)) ; テモゾロミド (例えば、TEMODAR (登録商標)) ; テニボシド/VM-26 (例えば、VUMON (登録商標)) ; テストラクトン (例えば、TESLAC (登録商標)) ; 6-チオグアニン (6-TG) をはじめとするチオグアニン ; チオテパ (例えば、THIOPLEX (登録商標)) ; トポテカン (例えば、ハイカムチン (登録商標)) ; トレミフェン (例えば、フェアストン (登録商標)) ; トシツモマブ (例えば、BEXXAR (登録商標)) ; トラスツズマブ (例えば、HERCEPTIN (登録商標)) ; トレチノイン/ATRA (例えば、VESANOID (登録商標)) ; ウラシルマスタード ; バルビシン (例えば、VALSTAR (登録商標)) ; ビンブラスチン (例えば、VELBAN (登録商標)) ; ビンクリスチン (例えば、ONCOVIN (登録商標)) ; ビノレルビン (例えば、NAVELBINE (登録商標)) ; およびゾレドロン酸 (例えば、ZOMETA (登録商標)) が挙げられる。

10

20

30

40

【0390】

一例では、修飾されたヒアルロニダーゼ、例えば、PEG化rHuPH20などのヒアルロナン分解酵素が、ドセタキセル (例えば、タキソテール (登録商標))、ドキソルビシンリポソーム (例えば、ドキシル (登録商標))、リンゴ酸スニチニブ (例えば、SUTENT (登録商標)) またはベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)) のうち1種または複数の投与の後、投与と一致して、投与の前に対象に投与される。

【0391】

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、従来の化学療法に対して耐性である腫瘍の感受性を増大することができる。例えば、rHuPH20などの

50

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を、HYAL 1 欠乏と関連している腫瘍を有する患者に、腫瘍部位周囲の拡散を増大する（例えば、腫瘍部位中および腫瘍部位周囲の化学療法薬の循環および／または濃度を促進する）、ヒアルロン酸分解などによって腫瘍細胞運動性を阻害する、および／または腫瘍細胞アポトーシス閾値を低下させるのに有効な量で投与できる。これによって、腫瘍細胞（単数または複数）をアノイキスの状態に至らせることができ、これは腫瘍細胞を、化学療法薬の作用に対してより感受性にする。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与は、これまでは化学療法耐性であった膵臓、胃、結腸、卵巣および乳房の腫瘍の応答性を誘導し得る(Baumgartner et al. (1988) Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al. (1986) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390)。

10

【0392】

一例では、ヒアルロナン分解酵素、特に、ヒアルロニダーゼは、非癌性細胞に対して内因性ヒアルロニダーゼ活性が低下しているものをはじめとする転移性癌および非転移性癌の治療において使用される。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、単独で、またはその他の化学療法薬と組み合わせて化学療法薬として使用できる。例示的癌として、それだけには限らないが、小肺細胞癌腫、肺扁平上皮癌および乳房、卵巣、頭頸部の癌またはヒアルロニダーゼ活性の低下したレベルまたはヒアルロン酸異化作用の低下と関連している任意のその他の癌が挙げられる。

【0393】

c. 間質液圧の上昇と関連しているその他の疾患の治療における使用

20

また、提供される組成物および方法を使用して、それだけには限らないが、椎間板圧迫および臓器移植、卒中、脳外傷または本明細書に記載されるその他の状態によって引き起こされる浮腫をはじめとする浮腫を含めた、高い間質液圧と関連しているその他のヒアルロナン関連疾患を治療できる。

【0394】

3. 展着剤としての使用

一例では、本明細書に記載される方法を使用して製造されるヒアルロニダーゼ、例えば、rHuPH20などのヒアルロナン分解酵素は、in vivoで薬剤（単数または複数）および／または分子の、種々の哺乳類組織のいずれかへのデリバリーを促進または増強することによって、ヒアルロナン関連疾患または状態を治療するために投与される。ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、拡散を促進し、従って、小分子薬理作用物質ならびにタンパク質、核酸およびリボ核酸などの、より大きな分子の薬理作用物質および、それだけには限らないが、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、脂質ベースの分子および薬物をはじめとする成分の組合せを含有し得る高分子の組成物のデリバリーを推進し得る。例えば、約10nmから約500nmの範囲の直径の分子および高分子複合体は、間質空間がそれまでにヒアルロニダーゼに曝露されていた、または同時に曝露される場合に、間質空間を通るデリバリーにおいて劇的な改善を示し得る。（例えば、米国特許出願第10／795,095号、同11／065,716号および同11／238,171号参照）。

30

【0395】

40

可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与とともに、または投与後に投与できる、医薬品、治療薬、治療および化粧剤、分子および治療の例として、それだけには限らないが、麻酔薬；代謝拮抗薬、抗新生物薬、化学療法薬およびその他の抗癌剤および抗癌治療；抗ウイルス薬；抗菌薬およびその他の抗生物質、抗真菌薬およびその他の抗感染薬を含めた抗感染薬；免疫調節薬；ステロイド系および非ステロイド系抗胃炎症薬； β 遮断薬；交感神経模倣薬；ドコサノイド (docosanoids)、プロスタグランジンおよびプロスタグランジン類似物；縮瞳薬、コリン作動薬および抗コリンエステラーゼ薬；抗アレルギー剤および鬱血除去薬；ホルモン剤；増殖因子；免疫抑制剤；ワクチンおよびトキソイド；抗血清；抗体；鎮痛薬、抗炎症薬、抗菌薬、殺アメーバ剤、殺トリコモナス剤、抗パーキンソン病薬、抗マラリア薬、抗痙攣薬、抗抑制薬、抗関節炎薬、抗

50

真菌薬、抗高血圧薬、解熱薬、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン薬、 α -アドレナリン作動性アゴニスト剤、 α 遮断薬、麻酔薬、気管支拡張剤、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、 β アドレナリン作動性の遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、心血管薬剤、避妊薬、化粧剤または審美剤、鬱血除去薬、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質物質、催眠薬、ホルモン剤、血糖上昇剤、筋弛緩薬、筋肉収縮剤、眼科用剤、副交感神経作動薬、精神賦活剤、鎮静薬、睡眠誘導物質、交感神経作用薬、トランキライザー物質、尿路剤、腔剤、抗ウイルス剤、ビタミン剤、非ステロイド系抗炎症薬およびアンジオテンシン変換酵素阻害剤ならびにそれらの組合せが挙げられる。

【0396】

4. 皮下点滴療法における使用

皮下点滴療法、皮膚の皮下組織への流体および電解液の注入は、軽度から中程度の脱水状態の成人患者、特に、高齢者に適した、有用で簡単な水和技術である。安全および有効と考えられるが、ほとんどのよくある悪影響は、局所マッサージまたは全身性利尿薬によって治療できる軽度の皮下浮腫である。2箇所の別個の部位で24時間で約3Lを与えることができる。一般的な注入部位として、胸部、腹部、大腿および上腕が挙げられる。皮下点滴療法において使用される溶液として、例えば、生理食塩水、2分の1生理食塩水、生理食塩水を含むグルコースおよび5%グルコースが挙げられる。塩化カリウムも溶液に加えることができる。溶液へのヒアルロニダーゼなどの1種または複数のヒアルロナン分解酵素の添加は、流体吸収を増強し、全体的な投与率を高めることができる。したがって、提供された組成物および方法を使用して、対象への投与による皮下点滴療法を処理できる。

【0397】

5. 硝子体切除術および眼部障害および状態に対する適用

可溶性ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を含有する提供された組成物を使用して、硝子体切除術の際の網膜の剥離または断裂を最小にすることができる。このような断裂は、例えば、硝子体の除去に先立って、硝子体を網膜から分離されるまたは「挿入されていない」ようにできる。硝子体のこのような挿入されていないことまたは分離されていることは、硝子体が除去されるときに網膜のさらなる断裂または剥離が起こる可能性を最小にできる。

【0398】

提供される、ヒアルロニダーゼ組成物をはじめとするヒアルロナン分解酵素組成物および方法を、米国特許第5,292,509号に記載される硝子体切除術補助剤適用をはじめとする種々の眼部適用のために使用できる。本明細書に記載される方法によって製造および精製された、ヒアルロニダーゼ、例えば、rHuPH20などの高度に精製されたヒアルロナン分解酵素の使用が、眼球内手順にとって免疫原性および毒性を最小化するために望ましい。いくつかの例では、PEG化ヒアルロニダーゼを使用して、硝子体液内での居留を延長し、局所的な取り込みを防ぐことができる。

【0399】

提供された、可溶性ヒアルロニダーゼを含有する組成物をはじめとするヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、例えば、新血管新生を妨げ、網膜に対して有毒な物質の硝子体液からのクリアランス速度を高めることによって眼部障害を治療および／または予防できる。ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素は、眼に対して中毒性障害を引き起こすことなく眼の硝子体液を液化するのに有効な量で投与できる。硝子体液の液化は、硝子体房(vitreous chamber)からの液体交換速度を高める。この交換時の増大によって、存在が眼科的損傷および網膜損傷を引き起こし得る汚染物質が除去される。

【0400】

また、提供された、ヒアルロニダーゼ組成物をはじめとするヒアルロナン分解酵素組成物および方法を使用して、術後圧力を低下させることができる。ヒアルロン酸は、眼において主として白内障および眼球内レンズ外科手技の際のスペーサーとして使用されてきた

。また、緑内障、硝子体および網膜手術などのその他の眼の外科手技において、また角膜移植においても使用される。術後白内障患者において起こるよくある副作用は、かなり早期の、時には長期の眼内圧の上昇である。このような状態は、特に、緑内障性視神経乳頭変化を有する患者では深刻であることもある。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、手術の前に眼にヒアルロン酸と同時投与し、眼において術後圧力を低下させることができる。例えば、ヒアルロニダーゼを、手術の際の有効性を低減することなく、患者において副作用を引き起こすことなくヒアルロン酸を分解することによって、眼内圧を術前レベルに低減するのに有効な量で投与できる（米国特許第6, 745, 776号）。

【0401】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素はまた、緑内障の患者に投与して、輪状網目構造からグリコサミノグリカン除去し、眼内圧を低下させることができ、硝子体に適用して、糖尿病性網膜症、網膜新血管新生、網膜静脈閉塞、後部硝子体剥離、網膜裂孔および眼外傷などの状態に関連して起こり得る硝子体出血（すなわち、硝子体への血液の血管外漏出）の回復を促進できる。通常、回復が遅い硝子体出血の存在は、それだけには限らないが、増殖性糖尿病性網膜症などの状態の主な治療であることが多いレーザー光凝固などの、診断のため、および／または治療手順のために、網膜が硝子体によって可視化されることを必要とする手順を遅延、複雑化し得る、または妨げ得る。

【0402】

6. 遺伝子療法適用

*in vivo*でのほとんどの遺伝子デリバリービヒクルの有効性は、*in vitro*で見られ、観察される有効性と対応しない。グリコサミノグリカンは、DNAおよびウイルスベクターの、多数の細胞種への導入および拡散を妨げ得る。このような細胞外マトリックス物質のレベルは、このプロセスを相当に妨げ得る。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与は、細胞外マトリックスのチャンネルを開け、したがって、遺伝子療法のデリバリーを増強することができる。例えば、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を、コラゲナーゼとともに投与して、*in vivo*でDNAの形質導入を促進できる(Dubinsky et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81(23):7529-33)。ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素は、アデノ随伴ウイルスを使用する遺伝子療法を増強できる(Favre et al. (2000) Gene Therapy 7(16):1417-20)。例えば、ヒアルロニダーゼの投与後に開かれるチャンネルは、通常、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびDNA複合体（ならびに注目するその他の治療薬および薬剤）などの小分子の拡散を増強する大きさのものである。しかし、孔は、細胞の転位および運動を促進するほど大きくはない。

【0403】

いくつかの例では、ウイルスを、ヒアルロニダーゼなどの1種または複数のヒアルロナン分解酵素を発現するよう、その複製および標的組織内の蔓延を促進するよう操作することができる。標的組織は、例えば、ウイルスが腫瘍内で選択的複製できる癌性組織であり得る。ウイルスはまた、組織特異的プロモーターのもとでウイルスが選択的に複製する非溶菌性ウイルスであり得る。ウイルスが複製するので、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の、ウイルス遺伝子との同時発現は、*in vivo*でのウイルスの蔓延を促進し得る。

【0404】

7. 化粧適用

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を投与して、セルライトの蓄積に関与するグリコサミノグリカン除去し、リンパ液の流れを促進できる。いくつかの例では、セルライトの治療のために、例えば、rHuPH20などのヒトヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素が使用される。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を、反復皮下注射によって軟膏もしくはクリーム形態の経皮デリバリーによって、または注射用持続放出処方使用によって投与し、グリコサミノグリカンの連続分解を促進し、その再現を防止できる。

【0405】

また、ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、「豚皮状」浮腫または「オレンジ皮状」浮腫などの状態を治療できる。ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素は、結合水の保持および代謝廃棄物を排除する有機液体の拡散の毛細血管圧縮による遅延に関与する、真皮中に蓄積し得る長いムコ多糖鎖の脱重合を達成できる。脂質細胞の脂肪過負荷と関連しているこのような水および廃棄物の保持が、従来の「豚皮状」浮腫または「オレンジ皮状」浮腫をなす。脱重合は、ムコ多糖の長い鎖を短い鎖に切断し、結合水および廃棄物の排出ならびに静脈循環およびリンパ循環の回復をもたらし得、結果的に、局所浮腫の消失になる。

【0406】

8. 臓器移植における使用

臓器中のヒアルロン酸の含量は、炎症で増大し得る。肺肺炎(Nettelbladt et al. (1991) Am. Rev. Resp. Dis. 139: 759-762)および心筋梗塞(Waldenstrom et al. (1991) J. Clin. Invest. 88(5): 1622-1628)などの炎症性—免疫学的傷害を特徴とする種々の臓器に由来する組織においてヒアルロン酸の濃度の増大が観察されている。その他の例として、腎移植(Haellgren et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 2063-2076; Wells et al. (1990) Transplantation 50: 240-243)、小腸移植(Wallander et al. (1993) Transplant. Int. 6: 133-137)または心臓移植(Haellgren et al. (1990) J Clin Invest 185:668-673)後の同種移植片拒絶;またはウイルス起源の心筋炎症 (Waldenstrom et al. (1993) Eur. J. Clin. Invest. 23: 277-282)が挙げられる。臓器の移植に関連する間質性浮腫の出現は、移植手術の分野では重大な問題をなす。間質性浮腫を有する移植片は、機能が一時的に失われるような程度に膨潤し得る。いくつかの例では、膨潤は腎臓の破壊を引き起こし、広範囲の出血をもたらし得る。ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、臓器移植片中の蓄積したグリコサミノグリカン分解できる。このようなグリコサミノグリカンの除去が、移植片からの水の除去を促進し、臓器機能を増強する。

【0407】

9. 脳におけるグリコサミノグリカン蓄積の治療における使用

いくつかの脳脊髄の病的状態では、ヒアルロン酸レベルが上昇している。脳脊髄のヒアルロン酸のレベルは、通常、成人において $200 \mu\text{g/L}$ 未満である(Laurent et al. (1996) Acta Neurol Scand September 94(3):194-206)が、髄膜炎、脊柱管狭窄、頭部外傷および大脳梗塞などの疾患では、 $8000 \mu\text{g/L}$ を超えるレベルに上昇し得る。例えば、rHuPH20などのヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を利用して、非常に上昇したレベルの基質を分解できる。

【0408】

脳に有効なリンパ管がないことも、頭部外傷後の生死にかかわる浮腫につながり得る。ヒアルロン酸蓄積は、ヒアルロン酸シンターゼによる合成の増大および分解の減少の結果である。ヒアルロン酸の蓄積は、最初、損傷を受けた組織において水分含量の増大という有益な目的を果たし、白血球の血管外漏出を促進し得るが、蓄積の継続は致死的であり得る。頭部外傷を受けている患者への、くも膜下腔内または静脈内などへのヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与は、組織ヒアルロン酸蓄積およびそれと関連している水の除去するよう働き得る。

【0409】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素はまた、脳腫瘍と関連している浮腫、特に、多形神経膠芽腫と関連している浮腫の治療において使用できる。脳腫瘍と関連している浮腫は、腫瘍に隣接する脳の非癌性部分におけるヒアルロン酸の蓄積に起因する。ヒアルロン酸蓄積部位へのヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与(例えば、静脈内注射による、またはシャントによる)は、これらの部位の過剰なヒアルロン酸を分解することによって、このような悪性腫瘍と関連している浮腫を軽減できる。

【0410】

10. 心血管疾患におけるグリコサミノグリカン蓄積の治療における使用

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素は、一部の心血管疾患の治療において使用できる。実験的心筋梗塞後の、動物モデルにおけるヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素の投与は、梗塞の大きさを低減し得る(Maclean、et al (1976) Science 194(4261):199-200)。このことが起こり得る1つの提案される機序は、虚血再灌流後に生じるヒアルロン酸蓄積を低減することによってである。梗塞の大きさの低減は、リンパ排液の増大および組織酸素化の増大および心筋水分含量の低減から起こると考えられる。

【0411】

ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、動脈硬化症からの冠動脈プラークを制限できる。このようなプラークは、グリコサミノグリカン蓄積し、マクロファージを媒介し、細胞間接着を形成する(f o a m) (Kolodgie et al. (2002) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22(10):1642-8)。

【0412】

11. 肺疾患における使用

正常な個体由来の気管支肺胞上皮洗浄液(BAL)中のヒアルロン酸のレベルは、通常、15 ng/ml未満である。しかし、呼吸困難の状態では、BAL中のヒアルロン酸レベルは劇的に上昇する(Bjermer et al.(1987) Br Med J (Clin Res Ed) 295(6602):803-6)。肺におけるヒアルロン酸の増大は、酸素拡散およびガス交換ならびに好中球およびマクロファージ応答の活性化を妨げ得る。例えば、rHuPH20などのヒアルロナン分解酵素の精製された調製物、例えば、本明細書において提供される方法を使用して製造されるものは、肺デリバリーまたは静脈内デリバリーのいずれかによって、このような状態を提示する患者にデリバリーされ、ヒアルロナンレベルを低減し得る。ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素はまた、グリコサミノグリカンの上昇と関連しているその他の肺の合併症を患う患者に投与でき、またはその他の肺に同時デリバリーされる分子のデリバリーを増強できる。

【0413】

12. その他の使用

その治療的使用のさらなる例では、ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を、ピンカアルカロイドなどの壊死物質の静脈傍注射からの局所壊死に対する解毒薬、神経節嚢胞の治療(Paul et al. (1997) J Hand Surg. 22 (2): 219-21)および静脈不全による組織壊死の治療(Elder et al. (1980) Lancet 648-649)のような目的で使用できる(Few et al. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26)。また、ヒアルロニダーゼをはじめとするヒアルロナン分解酵素を使用して、最もよく見られる手の軟組織塊であり、皮膚の下に障ることができる液体で満たされた嚢である、神経節嚢胞(手首嚢胞、聖書嚢胞、背側腱嚢胞としても知られる)を治療できる。

【0414】

ヒアルロニダーゼなどのヒアルロナン分解酵素を、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)を分解することによって脊髄損傷の治療に使用できる。脊髄損傷後、星状細胞によってCSPGを含有する神経膠瘢痕が産生される。CSPGは、軸索成長の阻害において重要な役割を果たす。さらに、CSPGの発現は、中枢神経系(CNS)の損傷後増大することがわかっている。また、ヒアルロナン分解酵素を化学的髄核融解術として知られる過程において椎間板ヘルニアの治療に利用できる。コンドロイチナーゼABC、ヒアルロニダーゼと同様の基質を切断する酵素は、腰椎において椎間板内圧力の低減を誘導できる。3種の椎間板損傷がある。突出型椎間板は、無傷であるが、膨隆しているものである。脱出型椎間板では、線維包(fibrous wrapper)は、破れており、髄核(NP)がはみ出しているがまだ椎間板と結び付いている。遊離型椎間板では、NPの断片が破壊されて椎間板から遊離しており、脊柱管中に遊離している。化学的髄核融解術は、通常、突出型および脱出型椎間板に対して有効であるが、遊離型椎間板損傷に対しては有効ではない。

【0415】

I. 実施例

以下の例は、単に例示的目的のために含まれるのであって、本発明の範囲を制限しようとするものではない。

【実施例 1】

【0416】

可溶性 rHuPH20 を発現する細胞株の作製

HZ24 プラスミド（配列番号 52 に示される）を使用して、チャイニーズハムスター卵巣（CHO 細胞）をトランスフェクトした（例えば出願番号第 10, 795, 095 号、同 11/065, 716 号および同 11/238, 171 号参照）。可溶性 rHuPH20 の発現のための HZ24 プラスミドベクターは、pCI ベクター骨格（Promega）10、ヒト PH20 ヒアルロニダーゼのアミノ酸 1~482 をコードする DNA（配列番号 49）、ECMV ウイルス由来の内部リボソーム進入部位（IRES）（Clontech）およびマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子を含む。pCI ベクター骨格はまた、β-ラクタマーゼ耐性遺伝子をコードする DNA（AmpR）、f1 複製起点、サイトメガロウイルス最初期エンハンサー／プロモーター領域（CMV）、キメライントロンおよび SV40 後期ポリアデニル化シグナル（SV40）も含む。可溶性 rHuPH20 構築物をコードする DNA は、ヒト PH20 の天然の 35 アミノ酸シグナル配列のアミノ酸位置 1 のメチオニンをコードする DNA の前に NheI 部位および Kozak コンセンサス配列ならびに配列番号 1 に示されるヒト PH20 ヒアルロニダーゼのアミノ酸位置 482 に対応するチロシンをコードする DNA の後に停止コドン、続いて、20 BamHI 制限部位を含む。したがって、構築物 pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa（HZ24）は、内部リボソーム進入部位（IRES）によって分離されている、ヒト PH20 のアミノ酸 1~482（配列番号 3 に示される）およびマウスジヒドロ葉酸レダクターゼのアミノ酸 1~186（配列番号 53 に示される）をコードする、CMV プロモーターによって駆動される単一の mRNA 種をもたらす。

【0417】

4 mM グルタミンおよび 18 ml/L Plurionic F68/L（Gibco）を補給した DHFR（-）細胞のための GIBCO 改変 CD-CHO 培地で増殖する非トランスフェクト DG44 CHO 細胞を、トランスフェクションのための調製物中、振盪フラスコ中に 0.5×10^6 個細胞/ml で播種した。細胞を、120 rpm で振盪しながら、加湿したインキュベーター中 5% CO₂ 中、37℃ で増殖させた。対数増殖中の非トランスフェクト DG44 CHO 細胞を、トランスフェクションの前に生存力について試験した。30

【0418】

非トランスフェクト DG44 CHO 細胞培養物のうち 600 万個の生存細胞を、ペレットにし、0.7 mL の 2×トランスフェクションバッファー（2×HeBS：40 mM Hepes、pH 7.0、274 mM NaCl、10 mM KCl、1.4 mM Na₂HPO₄、12 mM デキストロース）に、 2×10^7 個細胞の密度で再懸濁した。再懸濁された細胞の各アリコートに、0.09 mL（250 μg）の直鎖 HZ24 プラスミド（ClaI（New England Biolabs）とともに一晩消化によって直線化された）を加え、室温で細胞/DNA 溶液を、0.4 cm gap BTX（Genetronics）エレクトロポレーションキューベットに移した。陰性対照エレクトロポレーションは、細胞と混合されるプラスミド DNA を用いずに実施した。細胞/プラスミド混合物に、330 V および 960 μF または 350 V および 960 μF でのコンデンサ放電を用いてエレクトロポレーションを行った。40

【0419】

エレクトロポレーション後、キューベットから細胞を回収し、5 mL の、4 mM グルタミンおよび 18 ml/L Plurionic F68/L（Gibco）を補給した DHFR（-）細胞のための改変 CD-CHO 培地に移し、加湿したインキュベーター中、5% CO₂、37℃ で 2 日間、選択せずに、6 ウェル組織培養プレートのウェル中で増殖50

させた。

【0420】

エレクトロポレーションの2日後、各ウェルから0.5mLの組織培養培地を回収し、実施例2に記載されるマイクロ濁度アッセイを使用して、ヒアルロニダーゼ活性の存在について検査した。

【0421】

【表3】

表3: トランスフェクションの40時間後のH Z24によってトランスフェクトされたDG44 CHO細胞の初期ヒアルロニダーゼ活性		
	希釈	活性 単位/ml
トランスフ ェクション1 330V	1対10	0.25
トランスフ ェクション2 350V	1対10	0.52
陰性対照	1対10	0.015

10

20

【0422】

トランスフェクション2(350V)から得た細胞を、組織培養ウェルから集め、カウントし、1mlあたり $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 個の生存細胞に希釈した。細胞懸濁液の0.1mLのアリコートをし、5枚の96ウェル丸底組織培養プレートの各ウェルに移した。100マイクロリットルの、4mMのGlutaMAX(商標)-1サプリメント(GIBCO(商標)、Invitrogen Corporation)を含有し、ヒポキサンチンおよびチミジンサプリメントは含まないCD-CHO培地(GIBCO)を、細胞を含有するウェルに加えた(最終容量0.2mL)。

【0423】

メトトレキサートを用いずに増殖させた5枚のプレートから10個のクローンを同定した。

表4. 同定されたクローンのヒアルロニダーゼ活性

【0424】

【表4】

プレート/ウェル ID	相対ヒアルロニ ダーゼ
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

30

40

50

【0425】

6個のH Z 2 4クローンを培養で拡大し、単細胞懸濁液として振盪フラスコに移した。クローン3 D 3、3 E 5、2 G 8、2 D 9、1 E 1 1および4 D 1 0を、細胞を、左上隅のウェルで5 0 0 0個細胞で出発し、プレートを下に1 : 2希釈、プレートを横に1 : 3希釈した二次元無限希釈戦略を使用して9 6ウェル丸底組織培養プレートにプレーティングした。希釈したクローンを、培養中最初の数日間に必要な増殖因子を提供するために、ウェルあたり5 0 0個の非トランスフェクトD G 4 4 C H O細胞のバックグラウンド中で増殖させた。サブクローンあたり1 0枚のプレートを作製し、5枚のプレートは5 0 n Mメトトレキサートを含有し、5枚のプレートはメトトレキサートを含有しなかった。

【0426】

クローン3 D 3から2 4個の眼に見えるサブクローンが得られた（メトトレキサート処理なしから1 3個、5 0 n Mメトトレキサート処理から1 1個。2 4個のサブクローンのうち8個から得た上清において、相当なヒアルロニダーゼ活性が測定され（> 5 0 ユニット／m L）、これら8個のサブクローンをT - 2 5組織培養フラスコに拡大した。メトトレキサート処理プロトコルから単離されたクローンを、5 0 n Mのメトトレキサートの存在下で拡大した。クローン3 D 3 5 Mを、5 0 0 n Mメトトレキサート中でさらに拡大し、振盪フラスコ中で1 , 0 0 0 ユニット／m lを超えて産生するクローンを生じさせた（クローン3 D 3 5 M；またはG e n 1 3 D 3 5 M）。次いで、3 D 3 5 M細胞のマスター細胞バンク（M C B）を調製した。

【実施例2】

【0427】

可溶性r H u P H 2 0のヒアルロニダーゼ活性の決定

細胞培養物、精製画分および精製溶液などのサンプル中の可溶性r H u P H 2 0のヒアルロニダーゼ活性を、ヒアルロン酸が血清アルブミンと結合するときの不溶性沈殿の形成に基づく比濁アッセイを使用して決定した。活性は、可溶性r H u P H 2 0を、ヒアルロン酸ナトリウム（ヒアルロン酸）とともに一定期間（1 0分）インキュベートすることおよび未消化のヒアルロン酸ナトリウムを酸性化血清アルブミンの添加によって沈殿させることによって測定される。得られたサンプルの濁度を、3 0分の発現期間の後、6 4 0 n mで測定する。ヒアルロン酸ナトリウム基質の酵素活性に起因する濁度の低下が、可溶性r H u P H 2 0ヒアルロニダーゼ活性の尺度である。方法は、可溶性r H u P H 2 0アッセイ作業参照標準の希釈物を用いて作製した較正曲線を使用して実施され、サンプル活性測定は、この較正曲線に対して行われる。サンプルの希釈物は、酵素希釈溶液で調製した。酵素希釈溶液は、3 3 . 0 ± 0 . 0 5 m gの加水分解ゼラチンを、2 5 . 0 m Lの5 0 m M P I P E S 反応バッファー（1 4 0 m M N a C l、5 0 m M P I P E S、p H 5 . 5）および2 5 . 0 m LのS W F Iに溶解すること、および0 . 2 m Lの2 5 % B u m i n a t e 溶液を混合物に希釈することおよび3 0秒間ボルテックス処理することによって調製した。これは、使用の2時間以内に実施し、必要になるまで氷上で保存した。サンプルを推定1 ~ 2 U / m Lに希釈した。通常、工程あたりの最大希釈は、1 : 1 0 0を超えず、第1の希釈のための最初のサンプルサイズは、2 0 μ L以上であった。アッセイを実施するために必要な最小サンプル容積は：インプロセスサンプル、F P L C画分：8 0 μ L；組織培養上清：1 m L；濃縮物質8 0 μ L；精製または最終工程物質：8 0 μ Lであった。希釈は、低タンパク質結合9 6ウェルプレート中で3連で行い、3 0 μ Lの各希釈物をO p t i l u x 黒色／透明底プレート（B D B i o S c i e n c e s）に移した。

【0428】

2 . 5 U / m Lの濃度を有する既知可溶性r H u P H 2 0の希釈物を、酵素希釈溶液で調製して標準曲線を作成し、O p t i l u x プレートに3連で加えた。希釈は、0 U / m L、0 . 2 5 U / m L、0 . 5 U / m L、1 . 0 U / m L、1 . 5 U / m L、2 . 0 U / m Lおよび2 . 5 U / m Lを含んでいた。6 0 μ Lの酵素希釈溶液を含有していた「試薬ブランク」ウェルを、陰性対照としてプレートに含めた。次いで、プレートにカバーをし

10

20

30

40

50

、ヒートブロック上、37℃で5分間加温した。カバーを除去し、プレートを10秒間振盪した。振盪後、プレートをヒートブロックのプレートに戻し、MULTIDROP 384 Liquid Handling装置に、加温0.25mg/mLヒアルロン酸ナトリウム溶液を入れた(100mgのヒアルロン酸ナトリウム(LifeCore Biomedical))を20.0mLのSWFIに溶解することによって調製した。これを、完全に溶解するまで、2~8℃で2~4時間穏やかに回転および/または振動することによって混合した)。反応プレートをMULTIDROP 384に移し、起動キーを押すことによって反応を開始し、30μLのヒアルロン酸ナトリウムを各ウェルに分配した。次いで、プレートをMULTIDROP 384から回収し、10秒間振盪し、その後、ヒートブロックに移し、プレートカバーを交換した。プレートを37℃で10分間インキュベートした。

10

【0429】

MULTIDROP 384は、機械に血清作業溶液を入れることおよび240μLに溶液設定を変更することによって、反応を停止するよう準備した。(500mM酢酸バッファー溶液75mL中、25mLの血清保存溶液[1容量のウマ血清(Sigma))を、9容積の500mM酢酸バッファー溶液で希釈し、pHを塩酸を用いて3.1に調整した])。プレートをヒートブロックから回収し、MULTIDROP 384におき、240μLの血清作業溶液をウェルに分配した。プレートを回収し、プレートリーダー上で10秒間振盪した。さらに15分後、640nmでサンプルの濁度を測定し、各サンプルのヒアルロニダーゼ活性(U/mL)を、標準曲線にフィッティングすることによって求めた。

20

【0430】

比活性(ユニット/mg)は、ヒアルロニダーゼ活性(U/mL)をタンパク質濃度(mg/mL)によって除することによって算出した。

【実施例3】

【0431】

Gen1ヒトsPH20の製造および精製

A. 5Lバイオリアクター工程

3D35Mのバイアルを解凍し、振盪フラスコから、100nMメトトレキサートおよびGlutaMAX(商標)-1(Invitrogen)を補給したCD-CHO培地(Invitrogen、Carlsbad Calif.)中で1Lのスピナーフラスコによって拡大した。細胞を、1mLあたり 4×10^5 個の生存細胞の播種密度でスピナーフラスコから5Lのバイオリアクター(Braun)に移した。パラメータは、溶存酸素設定値25%および0~100cc/分のエアオーバーレイを用いて、温度設定値37℃、pH7.2(開始設定値)であった。168時間で、250mLのフィード1培地(50g/Lグルコースを含むCD-CHO)を加えた。216時間で、250mLのフィード2培地(50g/Lグルコースおよび10mM酪酸ナトリウムを含むCD-CHO)を加え、264時間で、250mLのフィード2培地を加えた。この工程の結果、1mLあたり1600ユニットの最終生産性および 6×10^6 個細胞/mLの最大細胞密度が得られた。酪酸ナトリウムの添加は、製造の最終段階で可溶性rHuPH20の製造を著しく増強した。

30

40

【0432】

3D35Mクローンから得たコンディショニング培地を、10mM HEPES pH7.0への深層濾過および接線流ダイアフィルトレーションによって清澄化した。次いで、可溶性rHuPH20を、Qセファロース(Pharmacia)イオン交換、フェニルセファロース(Pharmacia)疎水性相互作用クロマトグラフィー、ボロン酸フェニル(Prometix)およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(Biorad, Richmond, CA)での連続クロマトグラフィーによって精製した。

【0433】

Qセファロースと結合している可溶性rHuPH20を、同一バッファー中、400m

50

M NaClで溶出した。溶出液を、2 M硫酸アンモニウムを用いて、500 mM硫酸アンモニウムの最終濃度に希釈し、フェニルセファロース (low sub) カラムを通して、続いて、同一条件下でポロン酸フェニル樹脂と結合させた。可溶性 rHuPH20 を、硫酸アンモニウムを含まない 50 mMピシ中 pH 9.0 で洗浄した後、フェニルセファロース樹脂から Hepes pH 6.9 中に溶出した。溶出液を、5 mMリン酸カリウムおよび 1 mM CaCl₂ 中、pH 6.9 でセラミックヒドロキシアパタイト樹脂上にロードし、0.1 mM CaCl₂ を含む 80 mMリン酸カリウム、pH 7.4 で溶出した。

【0434】

得られた精製可溶性 rHuPH20 は、USP 参照標準を使用するマイクロ濁度アッセイ (実施例 2) によって 65,000 USP ユニット/タンパク質 1 mg を超える比活性を有していた。一実施例では、天然 rHuPH20 の比活性は、約 120,000 ユニット/mg であったのに対し、PEG 化 rHuPH20 (以下の実施例 7 に記載される) は、約 30,000 ユニット/mg の比活性を有する。精製 sPH20 は、0.1% TFA/H₂O から 0.1% TFA/90% アセトニトリル/10% H₂O の間の勾配を用いて、Pharmacia 5RPC スチレンジビニルベンゼンカラムから 24~26 分から単一ピークとして溶出し、SDS 電気泳動によって単一のブロードな 61 kDa のバンドとして分離し、これは、PNGase-F での処理の際にシャープな 51 kDa のバンドに還元した。N 末端アミノ酸配列決定によって、リーダーペプチドは効率よく除去されていることが示された。

【0435】

B. 100 L のバイオリアクター細胞培養への上流細胞培養拡大工程

スケールアップ工程を使用して、3D35M 細胞の 4 種の異なるバイアルから可溶性 rHuPH20 を別個に精製して、4 種の別個のバッチの sHuPH20; HU A0406C、HU A0410C、HU A0415C および HU A0420C を製造した。各バイアルを、125 L のバイオリアクターによって別個に拡大および培養し、次いで、カラムクロマトグラフィーを使用して精製した。工程を通じてサンプルをとり、酵素収率などのパラメータを評価した。以下に提供されるプロセスの説明は、バイオリアクター出発および供給培地容積、移行細胞密度ならびに洗浄容積および溶出容積などの事柄の代表的な明細を示す。正確な数は、各バッチでわずかに変わり、表 10~11 に詳述されている。

【0436】

3D35M 細胞の 4 つのバイアルを 37℃ の水浴中で解凍し、100 nM メトトレキサートおよび 40 mL/L Glutamax を含有する CD CHO を加え、細胞を遠心分離した。細胞を、20 mL の新鮮培地を含む 125 mL の振盪フラスコ中で再懸濁し、37℃、7% CO₂ インキュベーター中に入れた。細胞を 125 mL の振盪フラスコ中で 40 mL にまで拡大した。細胞密度が、1.5~2.5 × 10⁶ 個細胞/mL に達した時点で、培養物を、100 mL の培養容積で 125 mL のスピナーフラスコに拡大した。このフラスコを、37℃、7% CO₂ でインキュベートした。細胞密度が、1.5~2.5 × 10⁶ 個細胞/mL に達した時点で、培養物を、200 mL の培養容積で 250 mL のスピナーフラスコに拡大し、フラスコを 37℃、7% CO₂ でインキュベートした。細胞密度が、1.5~2.5 × 10⁶ 個細胞/mL に達した時点で、培養物を、800 mL の培養容積で 1 L のスピナーフラスコに拡大し、37℃、7% CO₂ でインキュベートした。細胞密度が、1.5~2.5 × 10⁶ 個細胞/mL に達した時点で、培養物を、5 L の培養容積で 6 L のスピナーフラスコに拡大し 37℃、7% CO₂ でインキュベートした。細胞密度が、1.5~2.5 × 10⁶ 個細胞/mL に達した時点で、培養を、20 L の培養容積で 36 L のスピナーフラスコに拡大し、37℃、7% CO₂ でインキュベートした。

【0437】

125 L リアクターを、121℃、20 PSI の蒸気で滅菌し、65 L の CD CHO 培地を加えた。使用前に、リアクターを汚染について調べた。36 L のスピナーフラスコ

中の細胞密度が $1.8 \sim 2.5 \times 10^6$ 個の細胞/mL に達した時点で、20 L の細胞培養物を 36 L スピナーフラスコから 125 L バイオリアクター (Braun) に移し、85 L の最終容積および約 4×10^5 個細胞/mL の播種密度が得られた。パラメータは温度設定値、 37°C ；pH：7.2；溶存酸素： $25\% \pm 10\%$ ；羽根車速度 50 rpm；容器圧 3 psi；エアースパージ 1 L/分；エアーオーバーレイ：1 L/分であった。リアクターは、細胞数、pH 確認、培地分析、タンパク質製造および保持について毎日サンプリングした。実施の間に栄養供給を加えた。6 日目に、3.4 L の供給 1 培地 (CD CHO + 50 g/L グルコース + 40 mL/L Glutamax (商標) - 1) を加え、培養温度を 36.5°C に変更した。9 日目に、3.5 L の供給 2 (CD CHO + 50 g/L グルコース + 40 mL/L Glutamax (商標) - 1 + 1.1 g/L 酪酸ナトリウム) を加え、培養温度を 36°C に変更した。11 日目に、3.7 L の供給 3 (CD CHO + 50 g/L グルコース + 40 mL/L Glutamax (商標) - 1 + 1.1 g/L 酪酸ナトリウム) を加え、培養温度を 35.5°C に変更した。14 日目または細胞の生存力が 50% 未満に低下した時点でリアクターを回収した。この工程は、800 万個細胞/mL の最大細胞密度で、1600 ユニット/mL の酵素活性を有する可溶性 rHuPH20 の製造をもたらした。回収時に、培養を *in vitro* および *in vivo* でのマイコプラズマ、バイオバーデン、エンドトキシンおよびウイルス、ウイルス粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) および酵素活性のためにサンプリングした。

10

【0438】

100 リットルのバイオリアクター細胞培養回収を、ポリエーテルスルホン培地 (Sartorius) を有する一連のディスポーザブルカプセルフィルター：最初に、 $8.0 \mu\text{m}$ デブスカプセル、 $0.65 \mu\text{m}$ デブスカプセル、 $0.22 \mu\text{m}$ カプセルを通し、最後に、 $0.22 \mu\text{m}$ Sartopore 2000 cm^2 フィルターを通して、100 L 滅菌保存バッグに通して入れた。培養物を、らせん状ポリエーテルスルホン 30 kDa MWCO フィルター (Millipore) を用いる 2 つの TFF と、それに続く、10 mM HEPES、25 mM Na_2SO_4 、pH 7.0 を用いる 6 × バッファー交換を使用して 10 × 濃縮し、 $0.22 \mu\text{m}$ 最終フィルターへ入れ、20 L 滅菌保存バッグ中に入れた。表 5 は、細胞培養、回収量、濃度およびバッファー交換工程に関するモニタリングデータを提供する。

20

表 5. 細胞培養、回収量、濃度およびバッファー交換工程のモニタリングデータ

30

【0439】

【表 5】

パラメータ	HUA0406 C	HUA0401 0C	HUA0415 C	HUA0420 C
解凍から100Lバイオリアクターに播種するまでの時間(日)	21	19	17	18
100L播種密度($\times 10^6$ 個細胞/mL)	0.45	0.33	0.44	0.46
対数増殖における倍加時間(時間)	29.8	27.3	29.2	23.5
最大細胞密度($\times 10^6$ 個細胞/mL)	5.65	8.70	6.07	9.70
回収生存率(%)	41	48	41	41
回収力価(U/ml)	1964	1670	991	1319
100-Lバイオリアクター中の時間(日)	13	13	12	13
清澄化された回収容積(mL)	81800	93300	91800	89100
清澄化された回収物酵素アッセイ(U/mL)	2385	1768	1039	1425
濃縮物酵素アッセイ(U/mL)	22954	17091	8561	17785
バッファー交換濃縮物酵素アッセイ(U/mL)	15829	11649	9915	8679
濾過されたバッファー交換濃縮物酵素アッセイ(U/mL)	21550	10882	9471	8527
バッファー交換濃縮物容積(mL)	10699	13578	12727	20500
酵素単位の比率 濃縮物/回収物	0.87	0.96	1.32	1.4

【0440】

Qセファロース (Pharmacia) イオン交換カラム (3 L樹脂、高さ=20 cm、直径=14 cm) を調製した。洗浄サンプルを pH、伝導率の決定およびエンドトキシン (LAL) アッセイのために回収した。カラムを、5 カラム容積の 10 mM Tris、20 mM Na_2SO_4 、pH 7.5 を用いて平衡化した。濃縮した、ダイフィルトレーションした回収物を、100 cm/時間の流速で Q カラムにロードした。カラムを、5 カラム容積の 10 mM Tris、20 mM Na_2SO_4 、pH 7.5 および 10 mM Hepes、50 mM NaCl、pH 7.0 を用いて洗浄した。10 mM Hepes、400 mM NaCl、pH 7.0 を用いてタンパク質を溶出し、0.22 μm 最終フィルターを通して滅菌バッグ中に濾過した。

【0441】

フェニルセファロース (Pharmacia) 疎水性相互作用クロマトグラフィーを次に実施した。フェニルセファロース (PS) カラム (9.1 L樹脂、高さ=29 cm、直径=20 cm) を調製した。カラムを、5 カラム容積の 5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウム、0.1 mM CaCl_2 、pH 7.0 を用いて平衡化した。上記から得たタンパク質溶出液に、2 M 硫酸アンモニウム、1 M リン酸カリウムおよび 1 M CaCl_2 保存溶液を、それぞれ、5 mM、0.5 M および 0.1 mM の最終濃度に補給した。タンパク質を、100 cm/時間の流速で PS カラムにロードした。5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウムおよび 0.1 mM CaCl_2 pH 7.0 を

100 cm/時間で加えた。フロースルーを0.22 μmの最終フィルターに通し、滅菌バッグに入れた。

【0442】

PS精製したタンパク質を、5カラム容積の5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウムを用いて平衡化されている、アミノフェニルボロン酸カラム (Promedics) (6.3 L樹脂、高さ=20 cm、直径=20 cm) にロードした。タンパク質を、100 cm/時間の流速でカラムに通し、カラムを、5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウム、pH 7.0を用いて洗浄した。次いで、カラムを、20 mM ビシン、100 mM NaCl、pH 9.0を用いて洗浄し、タンパク質を、50 mM Hepes、100 mM NaCl pH 6.9を用い、滅菌フィルターを通して、20 L 滅菌バッグ中に溶出した。溶出液をバイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。

10

【0443】

ヒドロキシアパタイト (HAP) カラム (BioRad) (1.6 L樹脂、高さ=10 cm、直径=14 cm) を、5 mM リン酸カリウム、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂ pH 7.0を用いて平衡化した。洗浄サンプルを回収し、pH、伝導率およびエンドトキシンについて調べた (LALアッセイ)。アミノフェニルボロン酸精製されタンパク質に、リン酸カリウムおよびCaCl₂を5 mM リン酸カリウムおよび0.1 mM CaCl₂の最終濃度を得るよう補給し、100 cm/時間の流速でHAPカラムにロードした。カラムを、5 mM リン酸カリウム pH 7.0、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂、次いで、10 mM リン酸カリウム pH 7.0、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂ pHを用いて洗浄した。タンパク質を、70 mM リン酸カリウム pH 7.0を用いて溶出し、0.22 μmフィルターを通して濾過し、5 Lの滅菌保存バッグに入れた。溶出液を、バイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。

20

【0444】

次いで、HAP精製したタンパク質を、圧力タンクによって20 nM ウイルス除去フィルターを通して送った。タンパク質をDV20圧力タンクおよびフィルター (Pall Corporation) に加え、20 nmの孔を有するUltipor DV20フィルター (Pall Corporation) を通して、滅菌20 L保存バッグに入れた。濾液を、タンパク質濃度、酵素活性、オリゴ糖、単糖およびシアル酸 プロファイリングおよび工程関連不純物について調べた。次いで、濾液中のタンパク質を、10 kD分子量カットオフ (MWCO) Sartocoon Slice 接線流濾過 (TFF) システム (Sartorius) を使用して1 mg/mLに濃縮した。フィルターは、Hepes/生理食塩水溶液 (10 mM Hepes、130 mM NaCl、pH 7.0) を用いて洗浄することによってまず調製し、透過物を、pHおよび伝導率のためにサンプリングした。濃縮後、濃縮されたタンパク質をサンプリングし、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。濃縮されたタンパク質で6×バッファー交換を実施して、最終バッファー: 10 mM Hepes、130 mM NaCl、pH 7.0にした。濃縮されたタンパク質を、0.22 μmフィルターに通し、20 L滅菌保存バッグに入れた。タンパク質をサンプリングし、タンパク質濃度、酵素活性、遊離スルフヒドリル基、オリゴ糖プロファイリングおよび浸透圧について調べた。

30

40

【0445】

表5~11は、各3D35M細胞ロットの上記の各精製工程と関連するモニタリングデータを提供する。

表6. Qセファロースカラムデータ

【0446】

【表 6】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
ロード容積(mL)	10647	13524	12852	20418
ロード容積/樹脂容積比	3.1	4.9	4.5	7.3
カラム容積(mL)	2770	3840	2850	2880
溶出物容積(mL)	6108	5923	5759	6284
溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
溶出物酵素アッセイ(U/mL)	24493	26683	18321	21052
酵素収率(%)	65	107	87	76

10

表 7. フェニルセファロースカラムデータ

【0447】

【表 7】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
保存溶液添加前の容積(mL)	5670	5015	5694	6251
ロード容積(mL)	7599	6693	7631	8360
カラム容積(mL)	9106	9420	9340	9420
ロード容積/樹脂容積比	0.8	0.71	0.82	0.89
溶出物容積(mL)	16144	18010	16960	17328
溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
溶出物酵素アッセイ(U/mL)	8806	6585	4472	7509
タンパク質収率(%)	41	40	36	37
酵素収率(%)	102	88	82	96

20

30

表 8. アミノフェニルボロン酸カラムデータ

【0448】

【表 8】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
ロード容積(mL)	16136	17958	16931	17884
ロード容積/樹脂容積比	2.99	3.15	3.08	2.98
カラム容積(mL)	5400	5700	5500	5300
溶出物容積(mL)	17595	22084	20686	19145
溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
濾過された溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	未試験	0.03	0.00	0.04
溶出物酵素アッセイ(U/mL)	4050	2410	1523	4721
タンパク質収率(%)	0	11	11	12
酵素収率(%)	未決定	41	40	69

10

表 9. ヒドロキシアパタイトカラムデータ

【0449】

【表 9】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
保存溶液添加前の容積(mL)	16345	20799	20640	19103
ロード容積/樹脂容積比	10.95	13.58	14.19	12.81
カラム容積(mL)	1500	1540	1462	1500
ロード容積(mL)	16429	20917	20746	19213
溶出物容積(mL)	4100	2415	1936	2419
溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	未試験	0.24	0.17	0.23
濾過された溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
溶出物酵素アッセイ(U/mL)	14051	29089	20424	29826
タンパク質収率(%)	未試験	93	53	73
酵素収率(%)	87	118	140	104

20

30

表 10. DV20 濾過データ

【0450】

40

【表 1 0】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容積(mL)	4077	2233	1917	2419
濾過物容積(mL)	4602	3334	2963	3504
濾過物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
濾過された溶出物のタンパク質濃度(mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
タンパク質収率(%)	未試験	93	82	101

10

表 1 1. 最終濃縮データ

【0 4 5 1】

【表 1 1】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容積(mL)	4575	3298	2963	3492
濃縮物容積(mL)	562	407	237	316
濃縮物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
タンパク質収率(%)	111	102	103	98

20

表 1 2. 最終処方データへのバッファー交換

【0 4 5 2】

【表 1 2】

パラメータ	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容積(mL)	562	407	237	316
最終容積バッファー交換濃縮物(mL)	594	516	310	554
濃縮物のタンパク質濃度(mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
濾過された濃縮物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.95	0.92	0.95	1.02
タンパク質収率(%)	118	99	110	101

30

【0 4 5 3】

精製され、濃縮された可溶性 r H u P H 2 0 タンパク質を、5 m L および 1 m L の充填容積を有する滅菌バイアルに無菌的に (a s c e p t i c a l l y) に詰めた。タンパク質を、オペレーターによって制御されるポンプに向けて 0. 2 2 μ m のフィルターを通し、これを使用し、重量測定読み出しを使用してバイアルに詰めた。バイアルを栓で閉め、圧着キャップで固定した。閉じたバイアルを、異質粒子について目視検査し、ラベルをつけた。ラベルをつけた後、バイアルを、液体窒素中にわずか 1 分沈めることによって急速冷凍し、 $\leq -15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$) で保存した。

40

【実施例 4】

【0 4 5 4】

可溶性ヒト P H 2 0 (r H u P H 2 0) を含有する G e n 2 細胞の製造

実施例 1 に記載される G e n 1 3 D 3 5 M 細胞株を、高メトトレキサートレベルに適

50

応させ、世代2 (Gen 2) クローンを作製した。3 D 3 5 M細胞は、確立されたメトトレキサート含有培養物から、4 mM Glutamax-1 商標および1.0 μ Mメトトレキサートを含有するCD CHO培地に播種した。細胞を、37°C、7% CO₂、加湿したインキュベーター中で増殖させ、46日間にわたって9回継代することによって高メトトレキサートレベルに適応させた。増殖した細胞集団を、2.0 μ Mメトトレキサートを含有する96ウェル組織培養プレートにおける制限希釈によってクローニングした。約4週間後、クローンを同定し、クローン3 E 1 0 Bを拡大のために選択した。3 E 1 0 B細胞を、4 mM Glutamax-1 商標および2.0 μ Mメトトレキサートを含有するCD CHO培地で20継代の間、増殖させた。3 E 1 0 B細胞株のマスター細胞バンク (MCB) を作製し、凍結し、その後の研究に使用した。

10

【0455】

細胞株の増幅は、3 E 1 0 B細胞を、4 mM Glutamax-1 商標および4.0 μ Mメトトレキサートを含有するCD CHO培地で培養することによって継続した。12回目の継代後、細胞を研究細胞バンク (RCB) としてバイアル中で凍結した。RCBの1つのバイアルを解凍し、8.0 μ Mメトトレキサートを含有する培地で培養した。5日後、培地中のメトトレキサート濃度を、16.0 μ Mに、次いで、18日後に20.0 μ Mに増大させた。20.0 μ Mメトトレキサートを含有する培地における8回目の継代から得た細胞を、4 mM Glutamax-1 商標および20.0 μ Mメトトレキサートを含有するCD CHO培地を含有する96ウェル組織培養プレートにおける制限希釈によってクローニングした。5~6週間後にクローンを同定し、クローン2 B 2を、20.0 μ Mメトトレキサートを含有する培地における拡大のために選択した。11回目の継代の後、2 B 2細胞を研究細胞バンク (RCB) としてバイアル中で凍結した。

20

【0456】

得られた2 B 2細胞は、可溶性組換えヒトPH20 (rHuPH20) を発現するジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損 (dhfr-) DG44 CHO細胞である。可溶性PH20は、2 B 2細胞中に、約206コピー/細胞のコピー数で存在する。rHuPH20特異的プローブを使用する、Spe I-、Xba I-およびBamH I/Hind I I I消化ゲノム2 B 2細胞DNAのサザンプロット分析は、以下の制限消化プロフィールを示した: Spe Iで消化されたDNAを用いて、約7.7 kbの1つのメジャーなハイブリダイズバンドおよび4つのマイナーなハイブリダイズバンド (約13.9、約6.6、約5.7および約4.6 kb); Xba Iで消化されたDNAを用いて、約5.0 kbの1つの主要なハイブリダイズバンドおよび2つの微量のハイブリダイズバンド (約13.9および約6.5 kb); ならびにBamH I/Hind I I Iで消化された2 B 2 DNAを使用して、約1.4 kbの1つの単一のハイブリダイズバンド。mRNA転写物の配列分析は、導かれたcDNA (配列番号56) は予測されるシトシン (C) の代わりにチミジン (T) であると観察された、位置1131の1つの塩基対相違を除いて、参照配列 (配列番号47) と同一であるということを示した。これは、アミノ酸配列に対する効果がないサイレント突然変異である。

30

【実施例5】

【0457】

300 Lのバイオリアクター細胞培養におけるGen 2可溶性rHuPH20の製造
HZ24-2 B 2のバイアルを解凍し、20 μ MメトトレキサートおよびGlutamax-1 商標 (Invitrogen) を補給したCD CHO培地 (Invitrogen、Carlsbad、CA) 中、36 Lスピナーフラスコによって振盪フラスコから拡大した。手短には、細胞のバイアルを37°Cの水浴中で解凍し、培地を加え、細胞を遠心分離した。細胞を、125 mLの振盪フラスコ中、20 mLの新鮮培地を用いて再懸濁し、37°C、7% CO₂ インキュベーター中に入れた。細胞を、125 mLの振盪フラスコ中で40 mLにまで拡大した。細胞密度が、1.5 $\times 10^6$ 個/mL超に達した時点で、培養物を、100 mLの培養容積で125 mLのスピナーフラスコ中に拡大した。このフラスコを、37°C、7% CO₂ でインキュベートした。細胞密度が、1.5 $\times 10$

40

50

6 個細胞/ mL 超に達した時点で、培養物を、 200 mL の培養容積で 250 mL のスピナーフラスコに拡大し、このフラスコを 37°C 、 7% CO_2 でインキュベートした。細胞密度が、 1.5×10^6 個細胞/ mL 超に達した時点で、培養物を、 800 mL の培養容積で 1 L のスピナーフラスコに拡大し、 37°C 、 7% CO_2 でインキュベートした。細胞密度が、 1.5×10^6 個細胞/ mL 超に達した時点で、培養物を、 5000 mL の培養容積で 6 L のスピナーフラスコに拡大し、 37°C 、 7% CO_2 でインキュベートした。細胞密度が、 1.5×10^6 個細胞/ mL 超に達した時点で、培養物を、 32 L の培養容積で 36 L のスピナーフラスコに拡大し、 37°C 、 7% CO_2 でインキュベートした。

【0458】

400 L のリアクターを滅菌し、 230 mL の $\text{CD}-\text{CHO}$ 培地を加えた。使用前に、リアクターを汚染について調べた。約 30 L の細胞を、 1 mL あたり 4.0×10^5 個の生存細胞の播種密度および 260 L の総容積で、 36 L のスピナーフラスコから 400 L のバイオリアクター (Braun) に移した。パラメータは、温度設定値、 37°C ；羽根車速度 $40 \sim 55\text{ RPM}$ ；容器圧： 3 psi ；エアースパージ $0.5 \sim 1.5\text{ L/分}$ ；エアオーバーレイ： 3 L/分 であった。リアクターは、細胞数、 pH 確認、培地分析、タンパク質製造および保持について毎日サンプリングした。また、実施の間に栄養供給を加えた。 120 時間 (5日) で、 10.4 L の供給1培地 ($4 \times \text{CD}-\text{CHO} + 33\text{ g/L}$ グルコース + 160 mL/L Glutamax-1 商標 + 83 mL/L Yeastolate + 33 mg/L rHuインスリン) を加えた。 168 時間 (7日) で、 10.8 L の供給2 ($2 \times \text{CD}-\text{CHO} + 33\text{ g/L}$ グルコース + 80 mL/L Glutamax-1 商標 + 167 mL/L Yeastolate + 0.92 g/L 酪酸ナトリウム) を加え、培養温度を 36.5°C に変更した。 216 時間 (9日) で、 10.8 L の供給3 ($1 \times \text{CD}-\text{CHO} + 50\text{ g/L}$ グルコース + 50 mL/L Glutamax-1 商標 + 250 mL/L Yeastolate + 1.80 g/L 酪酸ナトリウム) を加え、培養温度を 36°C に変更した。 264 時間 (11日) に、 10.8 L の供給4 ($1 \times \text{CD}-\text{CHO} + 33\text{ g/L}$ グルコース + 33 mL/L Glutamax-1 商標 + 250 mL/L Yeastolate + 0.92 g/L 酪酸ナトリウム) を加え、培養温度を 35.5°C に変更した。供給培地の添加は、製造の最終段階で可溶性 rHuPH20 の製造を著しく増強すると観察された。リアクターを、 14 日または 15 日で、または細胞の生存力が 40% 未満に低下した時点で回収した。この工程は、 1 mL あたり $17,000$ ユニットの最終生産性および 1200 万個細胞/ mL の最大細胞密度をもたらした。回収時に、培養を *in vitro* および *in vivo* でのマイコプラズマ、バイオーバーデン、エンドトキシンおよびウイルス、透過型電子顕微鏡 (TEM) および酵素活性のためにサンプリングした。

【0459】

培養物を、各々、 $4 \sim 8\text{ }\mu\text{m}$ に等級付けられた珪藻土の層および $1.4 \sim 1.1\text{ }\mu\text{m}$ に等級付けられた珪藻土の層を含有する、4つの平行な Millistak 濾過システムモジュール (Millipore) と、それに続く、セルロースメンブレンを通して、次いで、 $0.4 \sim 0.11\text{ }\mu\text{m}$ に等級付けられた珪藻土の層および $<0.1\text{ }\mu\text{m}$ に等級付けられた珪藻土の層を含有する、第2の単一の Millistak 濾過システム (Millipore) と、それに続く、セルロースメンブレンを通して、次いで、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 最終フィルターを通して蠕動ポンプによって、 350 L の容量を有する滅菌単回使用フレキシブルバッグに入れた。回収した細胞培養液に、 10 mM EDTA および 10 mM Tris を補給し、 7.5 の pH にした。培養物を、接線流濾過 (TFF) 装置を用い、4種の Sartoslice TFF 30 kDa 分子量カットオフ (MWCO) ポリエーテルスルホン (PES) フィルター (Sartorius) と、それに続く、 10 mM Tris、 20 mM Na_2SO_4 、 $\text{pH} 7.5$ を用いる $10 \times$ バッファー交換を使用して $10 \times$ 濃縮し、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ の最終フィルターに入れ、 50 L の滅菌保存バッグに入れた。

。

10

20

30

40

50

【0460】

濃縮された、ダイアフィルトレーションされた回収物を、ウイルスについて不活化させた。ウイルス不活性化に先立って、10% Triton X-100、3%トリ（n-ブチル）ホスフェート（TNBP）の溶液を調製した。濃縮された、ダイアフィルトレーションされた回収物を、36 Lのガラス反応容器中で、1% Triton X-100、0.3% TNBPに1時間曝露し、直後にQカラムで精製した。

【0461】

B. Gen 2可溶性rHuPH20の精製

Qセファロース（Pharmacia）イオン交換カラム（9 L樹脂、H=29 cm、D=20 cm）を調製した。洗浄サンプルを、pH、伝導率の決定およびエンドトキシン（LAL）アッセイのために回収した。カラムを、5カラム容積の10 mM Tris、20 mM Na₂SO₄、pH 7.5を用いて平衡化した。ウイルス不活性化後、濃縮された、ダイアフィルトレーションされた回収物を、100 cm/時間の流速でQカラムにロードした。カラムを5カラム容積の10 mM Tris、20 mM Na₂SO₄、pH 7.5および10 mM Hepes、50 mM NaCl、pH 7.0で洗浄した。10 mM Hepes、400 mM NaCl、pH 7.0を用いて、タンパク質を、0.22 μm最終フィルターに溶出し、滅菌バッグに入れた。溶出液サンプルを、バイオバーデン、タンパク質濃度およびヒアルロニダーゼ活性について調べた。交換の始めおよび最後にA₂₈₀吸光度読み取りをとった。

【0462】

フェニルセファロース（Pharmacia）疎水性相互作用クロマトグラフィーを次に実施した。フェニルセファロース（PS）カラム（19~21 L樹脂、H=29 cm、D=30 cm）を調製した。洗浄物を回収し、pH、伝導率およびエンドトキシン（LALアッセイ）のためにサンプリングした。カラムを、5カラム容積の5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウム、0.1 mM CaCl₂、pH 7.0を用いて平衡化した。Qセファロースカラムから得たタンパク質溶出液に、2 M 硫酸アンモニウム、1 M リン酸カリウムおよび1 M CaCl₂ 保存溶液を、それぞれ、5 mM、0.5 Mおよび0.1 mMの最終濃度を得るよう補給した。タンパク質を、100 cm/時間の流速でPSカラムにロードし、カラムフロースルー（flow thru）を回収した。カラムを、5 mMリン酸カリウム、0.5 M硫酸アンモニウムおよび0.1 mM CaCl₂ pH 7.0を、100 cm/時間で用いて洗浄し、回収されたフロースルーに洗浄液を加えた。カラム洗浄液と合わせ、フロースルーを、0.22 μm最終フィルターを通して、滅菌バッグに入れた。フロースルーを、バイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性のためにサンプリングした。

【0463】

アミノフェニルボロン酸カラム（ProMedics）を調製した。洗浄液を回収し、pH、伝導率およびエンドトキシン（LALアッセイ）のためにサンプリングした。カラムを、5カラム容積の5 mM リン酸カリウム、0.5 M硫酸アンモニウムを用いて平衡化した。精製タンパク質を含有するPSフロースルーを、アミノフェニルボロン酸カラムに、100 cm/時間の流速でロードした。カラムを、5 mMリン酸カリウム、0.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0を用いて洗浄した。カラムを、20 mMピシン、0.5 M硫酸アンモニウム、pH 9.0を用いて洗浄した。このカラムを、20 mMピシン、100 mM塩化ナトリウム、pH 9.0を用いて洗浄した。50 mM Hepes、100 mM NaCl、pH 6.9を用いてタンパク質を溶出し、滅菌フィルターを通して、滅菌バッグに入れた。溶出したサンプルを、バイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。

【0464】

ヒドロキシアパタイト（HAP）カラム（Biorad）を調製した。洗浄液を回収し、pH、伝導率およびエンドトキシン（LALアッセイ）について調べた。カラムを、5 mMリン酸カリウム、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂、pH 7.0を用

いて用いて平衡化した。アミノフェニルボロン酸精製したタンパク質を、5 mM リン酸カリウムおよび0.1 mM CaCl_2 の最終濃度に補給し、100 cm/時間の流速でHAPカラムにロードした。カラムを、5 mMリン酸カリウム、pH 7、100 mM NaCl 、0.1 mM CaCl_2 を用いて洗浄した。次いで、カラムを10 mMリン酸カリウム、pH 7、100 mM NaCl 、0.1 mM CaCl_2 を用いて洗浄した。タンパク質を、70 mMリン酸カリウム、pH 7.0を用いて溶出し、0.22 μm 滅菌フィルターを通して、滅菌バッグに入れた。溶出されたサンプルを、バイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。

【0465】

次いで、HAP精製されたタンパク質を、ウイルス除去フィルターに通した。まず、20 Lの70 mMリン酸カリウム、pH 7.0を用いて洗浄することによって滅菌Viosartフィルター（Sartorius）を調製した。使用前に、濾過されたバッファーをpHおよび伝導率のためにサンプリングした。HAP精製されたタンパク質を、蠕動ポンプによって、20 nMウイルス除去フィルターを通した。70 mMリン酸カリウム、pH 7.0中で濾過されたタンパク質を、0.22 μm 最終フィルターを通して、滅菌バッグに入れた。ウイルスフィルター処理されたサンプルを、タンパク質濃度、酵素活性、オリゴ糖、単糖およびシアル酸プロファイリングについて調べた。また、サンプルを工程関連不純物について調べた。

【0466】

次いで、濾液中のタンパク質を、10 kD分子量カットオフ（MWCO）Sartoon Slice接線流濾過（TFF）システム（Sartorius）を使用して10 mg/mLに濃縮した。まず、10 mMヒスチジン、130 mM NaCl 、pH 6.0を用いて洗浄することによってフィルターを調製し、pHおよび伝導率について透過物をサンプリングした。濃縮後、濃縮されたタンパク質をサンプリングし、タンパク質濃度および酵素活性について調べた。濃縮されたタンパク質で、最終バッファー：10 mMヒスチジン、130 mM NaCl 、pH 6.0への6×バッファー交換を実施した。バッファー交換後、濃縮されたタンパク質を、0.22 μm フィルターを通して、20 Lの滅菌保存バッグに入れた。タンパク質をサンプリングし、タンパク質濃度、酵素活性、遊離スルフヒドリル基、オリゴ糖プロファイリングおよび浸透圧について調べた。

【0467】

次いで、滅菌フィルター処理されたバルクタンパク質を、20 mLで30 mLの滅菌テフロンバイアル（Nalgene）に無菌的に分配した。次いで、バイアルを急速冷凍し、 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ で保存した。

【0468】

C. Gen 1可溶性rHuPH20およびGen 2可溶性rHuPH20の製造および精製の比較

300 Lのバイオリアクター細胞培養におけるGen 2可溶性rHuPH20の製造および精製は、100 Lのバイオリアクター細胞培養におけるGen 1可溶性rHuPH20の製造および精製（実施例3. Bに記載される）と比較して、プロトコールにおいていくつかの変化を含んでいた。表13は、方法間の、簡単なスケールアップ変化に加え、例示的相違を示す。

【0469】

10

20

30

40

【表 1 3 - 1】

表13		
プロセスの相違	Gen1可溶性rHuPH20	Gen2可溶性rHuPH20
細胞株	3D35M	2B2
細胞接種材料を拡大するために使用された培地	0.10μMメトトレキサート(0.045mg/L)を含む	20μMメトトレキサート(9mg/L)を含む
6L培養以降における培地	0.10μMメトトレキサートを含む	メトトレキサートを含まない
36Lスピナーフラスコ	機器使用なし 20L動作容積	pH、溶存酸素、スパージ、およびオーバーレイガスフロー速度をモニタリングし制御する機器使用が備えられている 32L動作容積
バイオリアクターにおける最終動作容積	125Lのバイオリアクター中、約100L(初期培養容積+65L)	400Lのバイオリアクター中、約300L(初期培養容積+260L)
最終バイオリアクター中の培養培地	rHuインスリンなし	5.0mg/L rHuインスリン
培地供給容積	バイオリアクター細胞培養容積の4%、すなわち、3.4、3.5および3.7Lで増やし、その結果、約92Lの標的バイオリアクター容積を得た	バイオリアクター細胞培養容積の4%、すなわち、10.4、10.8、11.2および11.7Lで増やし、その結果、約303Lの標的バイオリアクター容積を得た

10

20

30

【表 1 3 - 2】

<p>培地供給</p>	<p>供給1培地:CD CHO+50g/Lグルコース+8mM GlutaMAX(商標)-1</p> <p>供給2:(CD CHO+50g/Lグルコース+8mM GlutaMAX+1.1g/L酪酸ナトリウム</p> <p>供給3:CD CHO+50g/Lグルコース+8mM GlutaMAX+1.1g/L酪酸ナトリウム</p>	<p>供給1培地:4×CD CHO+33g/Lグルコース+32mM Glutamax+16.6g/L Yeastolate+33mg/L rHuインスリン</p> <p>供給2:2×CD CHO+33g/Lグルコース+16mM Glutamax+33.4g/L Yeastolate+0.92g/L酪酸ナトリウム</p> <p>供給3:1×CD CHO+50g/Lグルコース+10mM Glutamax+50g/L Yeastolate+1.80g/L酪酸ナトリウム</p> <p>供給4:1×CD CHO+33g/Lグルコース+6.6mM Glutamax+50g/L Yeastolate+0.92g/L酪酸ナトリウム</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>バイオリアクター細胞培養物の濾過</p>	<p>順次に、4種のポリエーテルスルホンフィルター(8.0μm、0.65μm、0.22μmおよび0.22μm)</p> <p>100L保存バッグ</p>	<p>最初の段階-各々、4～8μmに等級付けられた珪藻土の層および1.4～1.1μmに等級付けられた珪藻土の層を含む並行した4つのモジュールと、それに続く、セルロースメンブレン</p> <p>第2の段階-0.4～0.11μmに等級付けられた珪藻土の層および<0.1μmに等級付けられた珪藻土の層を含む単一のモジュールと、それに続く、セルロースメンブレン</p> <p>第3の段階-0.22μmのポリエーテルスルホンフィルター</p> <p>300Lの保存バッグ</p> <p>回収された細胞培養物に、10mM EDTAおよび10mM Trisを補給し、7.5のpHにする</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 1 3 - 3】

クロマトグラフィー前の濃縮およびバッファ交換	Millipore Spiral ポリエーテルスルホン 30K MWCO フィルターを用いる2回のTFFを用いる濃縮 10mM Hepes、25mM NaCl、pH7.0 を用いて濃縮物 6× をバッファ交換する 滅菌保存バッグ	4つのSartorius Sartolice TFF 30K MWCO フィルターを使用して濃縮する 10mM Tris、20mM Na2SO4、pH7.5 を用いて、濃縮物 10× をバッファ交換する 50L の滅菌保存バッグ
クロマトグラフィー前のウイルス不活化	なし	1% Triton X-100、0.3% リン酸トリブチル、pH7.5 の添加で実施されるウイルス不活化
最初の精製工程(Qセファロース)	吸光度読み取りなし	始めおよび最後での A280 測定
クロマトグラフィー後のウイルス濾過	Pall DV-20 フィルター (20nm)	Sartorius Virocart フィルター (20nm)
クロマトグラフィー後の濃縮およびバッファ交換	Hepes/生理食塩水pH7.0 バッファ 1mg/ml に濃縮されたタンパク質	ヒスチジン/生理食塩水、pH6.0 バッファ 10mg/ml に濃縮されたタンパク質

10

20

【実施例 6】

【0470】

30

ヒアルロナンリッチな腫瘍において組換えヒアルロニダーゼ (rHuPH20) を用いたヒアルロナンのターゲッティング

A. ヒアルロナンリッチな腫瘍細胞によるヒアルロナン特異的細胞周囲マトリックス Halo の In vitro 形成

ヒアルロナンリッチな腫瘍細胞培養およびヒアルロナン欠損腫瘍細胞培養物を、in vitro で細胞周囲マトリックス (halo) を形成する能力について、粒子排除アッセイおよび免疫組織化学を使用して評価した。この研究のために、ヒアルロナンリッチなヒト前立腺腫瘍癌腫 (PC3) の低密度培養物およびヒアルロナン欠損ヒト肺癌腫 (NCI H460) の低密度培養物を、細胞培地中、37℃で60分間処理し、続いて、0.5mg/mL の、大きな凝集性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるウシアグリカン (市販の) の存在下または不在下で、37℃で60分間インキュベートした。

40

【0471】

粒子排除によって、halo 形成を評価するために、培養物に小粒子 (5×10^6 個のホルマリン固定赤血球 (RBC)) を加えた。粒子が落ち着いた後、培養物を400×または100×倍率で視察した。

【0472】

免疫組織化学によってヒアルロナン発現を評価するために、培養物のサブセットを、ビオチン標識したヒアルロナン結合タンパク質 (HABP-bio) (Seikagaku, Japan) を用いて染色した。一次試薬を洗浄して除去した後、二次試薬としてFITC 標識したストレプトアビジン (Vector Labs, Canada) を使用した

50

。核をDAPI（4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）試薬を使用して対比染色した。Insight FireWireデジタルカメラ（Diagnostic Instruments、Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。

【0473】

細胞周囲マトリックスhaloを、HAについて、免疫組織化学によって陽性に染色する領域および粒子排除アッセイにおいて粒子（RBC）が排除される領域として同定した。結果は、アグリカンの存在下で前処理されているヒアルロナンリッチな腫瘍（PC3）培養物においてhalo（代表的な実験では、およそ細胞の大きさ）を示した。対照的に、アグリカンの不在下では、また、ヒアルロナン欠損（NCI H460）腫瘍細胞の培養物においてもhaloは形成せず、このことは、細胞周囲マトリックスの形成は、ヒアルロナン発現に応じて変わるということを示唆した。

10

【0474】

ヒアルロナンをターゲティングすることが、これらのhaloの形成を妨げ得るかどうかを調べるために、粒子排除研究および免疫組織化学を、（アグリカンの添加の前に）可溶性組換えヒトヒアルロニダーゼ組成物、指定されたrHuPH20の存在下または不在下で、37℃で60分間処理されている細胞培養物で実施した。rHuPH20は、1mLあたり1000酵素ユニットで腫瘍細胞培養物中に含まれていると、上記の実施例2に記載される方法を使用して調べられた。抗ヒアルロナン抗体（市販の）を用いる免疫蛍光染色は、rHuPH20とともにインキュベーションした後にヒアルロナン染色がないことを示した。rHuPH20とともにインキュベーションした後、上記のように、粒子アッセイを実施した。顕微鏡写真は、rHuPH20を用いると、（PC3）腫瘍細胞培養物においてhaloは形成しなかったということを示した。rHuPH20は、ヒアルロナン欠損細胞（NCI H460）培養物に対しては効果がなく、これは、rHuPH20を用いても用いなくても細胞周囲マトリックスを形成しなかった。これらの結果は、腫瘍細胞培養物におけるin vitro halo形成は、ヒアルロナン依存性であるという指摘を支持する。

20

【0475】

同じ粒子排除アッセイを、上記でこの実施例において記載されるように、さまざまな程度のHA発現を有する7種の異なる種類のヒト腫瘍細胞株を用い、rHuPH20の存在下または不在下で実施した。使用した細胞株は、BxPC3（膵臓腫瘍株）PC3（前立腺腫瘍株）、MDA-MB-231（乳房腫瘍株）、HCT 116（結腸腫瘍株）、DU145（前立腺腫瘍株）、MiaPaCa2（膵臓腫瘍株）およびH460（NSC肺癌株）であった。「細胞面積あたりのhalo」値は、ピクセルまたは mm^2 での平均細胞面積によって除した、培養皿中の平均halo面積（ピクセルまたは mm^2 で）を求めることによって決定した。種々の腫瘍細胞培養物における細胞面積あたりのhaloを比較するために、BxPC3細胞の値を100に設定し、HA欠損細胞株H460の値を0に設定し、比較によって各細胞種の「相対halo割合」を求めた。結果は、以下の表14に示されている。列挙される数字は、 $n=25$ 測定の平均±平均の標準誤差（SEM）を表す。

30

表14. 腫瘍細胞培養物における、相対Halo割合およびrHuPH20によるHA低下

40

【0476】

【表 1 4】

ヒト腫瘍種	細胞株	相対HALO割合	
		-rHuPH20	+rHuPH20
膵臓	BxPC3	100.0 ± 9.6	4.5 ± 0.8
前立腺	PC3	84.2 ± 4.6	14.2 ± 1.2
乳房	MDA-MB-231	82.1 ± 7.3	10.4 ± 1.3
結腸	HCT 116	50.8 ± 5.7	9.9 ± 0.9
前立腺	DU145	31.2 ± 4.3	5.5 ± 0.9
膵臓	MiaPaCa 2	16.7 ± 1.4	4.2 ± 0.7
NSC肺	H460	0.0 ± 0.8	- 2.3 ± 0.3

10

【0 4 7 7】

このアッセイを使用して、経時的研究も実施し、rHuPH20に対する細胞の一時的な曝露後のPC3培養物におけるHA除去の期間と、それに続く、細胞が酵素の不在下で細胞培地とともにインキュベートされる「追跡」期間を決定した。上記のように、ピクセルまたは mm^2 での平均細胞面積で除した、ピクセルまたは mm^2 での平均halo面積を測定することによって「細胞面積あたりのhalo」値を求めた。処理の前（時間ゼロ（0））に細胞面積あたりのhaloを算出し、100%と設定した。6つの処理時点の各々について、1000U/mL rHuPH20の存在下で細胞を1時間インキュベートし、酵素を除去するための洗浄および追跡期間を続け、ここで、細胞を酵素を伴わずに、それぞれ合計2、4、8、16、24および48時間インキュベートした。各時点について、細胞面積あたりのhaloを算出し、100%のゼロ時間値と比較することによって相対的なhalo割合を決定した。結果は、以下の表15に示されている。列挙される数字は、 $n = 45$ 測定の平均±平均の標準誤差（SEM）を表す。

20

表15：rHuPH20によるPC3細胞培養におけるHA除去の期間

【0 4 7 8】

【表 1 5】

1000U/mL rHuPH20の添加後の総時間(時間)(1時間のインキュベーションおよび追跡を含む)	相対halo割合(%)
0	100.00 ± 7.5
2	0.0 ± 2.7
4	3.2 ± 3.3
8	11.6 ± 4.4
16	64.4 ± 7.8
24	94.5 ± 5.6
48	92.7 ± 7.1

30

【0 4 7 9】

B. ヒアルロナンリッチな腫瘍モデル（脛骨周囲PC3前立腺癌腫異種移植片モデル）における静脈内rHuPH20投与は、遠位腫瘍間質液圧（IFP）を低下させる

ヒアルロナンリッチな腫瘍においてヒアルロナンをターゲティングする効果を分析するために、脛骨周囲前立腺癌腫（PC3）異種移植片モデルにおいてrHuPH20を全身投与した。このモデルのために、胸腺欠損雄ヌードマウスに、ヒト前立腺癌細胞、PC3（0.05mLの総容量で 1×10^6 個細胞）を用いて、右脛骨骨膜に隣接して接種した。すべての動物研究は、IACUCプロトコールに従って実施した。

【0 4 8 0】

これらの動物における腫瘍間質液圧（IFP）を評価するために、Milar（登録商

40

50

標) Mikro-tip カテーテル圧力トランスデューサー (SPR-320s) を、A D Instruments (登録商標) PowerLab 4/30 データ獲得ユニット および連続 I F P 測定のためにポータブルラップトップコンピュータに接続した (単位 = 水銀のミリメートル (mmHg))。システムを校正し、周囲圧力測定値が、15~20 分にわたって ± 1.0 mmHg を超えて外れない場合に安定と考えた。プローブ留置のために、圧力カテーテルを、21 ゲージニードルの内部の穴に挿入し、ニードルを腫瘍の中心に導入した。ニードルをトランスデューサーの周囲に引き、一方で、圧力カテーテルは、同時に適切な位置に保持された。次いで、システムを使用して、腫瘍における I F P を測定した (mmHg)。

【0481】

例示的な一実験では、この方法を用いる 26 の異種移植片モデル動物におけるベースライン遠位腫瘍 I F P 測定値は、腫瘍量と I F P の間の相関を示し (相関係数、 $r = 0.5652$)、このことは、腫瘍量の増大は、I F P の増大につながり得ることを示唆する。

【0482】

この異種移植片モデルにおいて、全身 rHuPH20 治療が、腫瘍 I F P を低下させ得るかどうかを調べるために、10,000 ユニット (実施例 2 において決定されるような) の rHuPH20 を、100 μ L の用量で、3 匹の動物の尾静脈における静脈内注射によって投与した。rHuPH20 を用いる投薬 (注射) の前に、I F P を約 20~30 分間測定して、ベースライン I F P 測定値を確立した。次いで、I F P を注射の間および注射後に測定した。I F P を、rHuPH20 投与後 1~2 時間測定した。静脈内 rHuPH20 投与は、遠位腫瘍 I F P の低減を引き起こした。10 分以内に、腫瘍 I F P は、ベースラインと比較して平均 34% 低下した。さらに、腫瘍 I F P レベルは、1 時間で 34.06 ± 15.9 mmHg から 14.86 ± 12.55 mmHg の最大低減に下がった (ベースラインレベルの平均 38%; 61.3% の平均低減)。動物に投与された熱不活化 rHuPH20 は、間質液圧を低下させなかった。

【0483】

迅速なヒアルロナンターオーバーと一致して、腫瘍 I F P は、すべてのマウスにおいて 24 時間以内にベースラインに戻った。最初の用量の 48 時間後に与えられた、10,000 ユニット rHuPH20 の反復静脈内投与は、同様の I F P の低下を示した (平均、ベースラインの 28.6%)。腫瘍を保持しない肢における rHuPH20 投与の前後にとられた測定値は、これらの組織における間質液圧において変化を示さなかった。これらのデータは、ヒアルロニダーゼの全身の、静脈内投与を使用して、遠位腫瘍において間質液圧を低下させることができるということを示した。

【0484】

間質液圧はまた、ヒアルロナン欠損肺癌腫細胞 (H460) の注射によって同様に作製した異種移植片モデルにおいても測定した。このモデルにおける腫瘍は、高間質液圧を示したが、rHuPH20 の静脈内投与の効果は、ヒアルロナンリッチな腫瘍モデルと比較してこのモデルではそれほど明白ではなく、このことは、腫瘍間質性圧力に対する rHuPH20 の効果がヒアルロナン依存性であるという指摘を支持した。

【実施例 7】

【0485】

rHuPH20 のペグ化

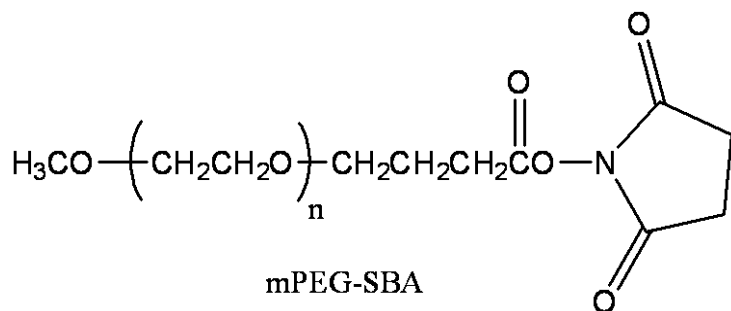
A. mPEG-SBA-30K の rHuPH20 とのコンジュゲーション

PEG 化可溶性ヒトヒアルロニダーゼを作製するために、rHuPH20 (約 60 kDa の大きさである) を 30 kDa のおよその分子量を有する、メトキシポリ (エチレングリコール) ブタン酸の直鎖 N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (mPEG-SBA-30K) と共有結合によってコンジュゲートした。mPEG-SBA の構造は、以下のスキーム 2 に示されている。

スキーム 2

【0486】

【化 2】



【0487】

10

rHuPH20をPEG化するために使用された、mPEG-SBA-30Kを調製するために使用される方法は、例えば、米国特許5,672,662号に記載されている。手短には、mPEG-SBA-30Kは、以下の手順に従って製造される：

【0488】

窒素雰囲気下、水素化ナトリウム（2当量）およびトルエンに、ジオキサンに溶解したマロン酸エチル（2当量）の溶液を1滴ずつ滴加する。トルエンにmPEGスルホン酸メタン（1当量、MW30kDa、Shearwater）を溶解し、上記の混合物に加える。得られた混合物を、約18時間還流する。反応混合物をその最初の容量の半量に濃縮し、10%NaCl水溶液を用いて抽出し、1%塩酸水溶液を用いて抽出し、水性抽出物を合わせる。集めた水層を、ジクロロメタン（3×）で抽出し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発乾固する。得られた残渣を、塩化ナトリウムを含有する1N水酸化ナトリウムに溶解し、混合物を1時間攪拌する。混合物のpHを、6N塩酸の添加によって約3に調整する。混合物をジクロロメタン（2×）を用いて抽出する。

20

【0489】

有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、冷ジエチルエーテルに注ぎ入れる。濾過によって沈殿を回収し、真空下で乾燥させる。得られた化合物をジオキサンに溶解し、8時間還流し、次いで、濃縮乾固する。得られた残渣を水に溶解し、ジクロロメタン（2×）を用いて抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶液をロータリーエバポレーションによって濃縮し、次いで、冷ジエチルエーテルに注ぎ入れる。濾過によって沈殿を回収し、真空下で乾燥させる。得られた化合物（1当量）をジクロロメタンに溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド（2.1当量）を加える。溶液を0℃に冷却し、ジクロロメタン中、ジシクロヘキシルカルボジイミド（2.1当量）の溶液を滴加する。溶液を室温で約18時間攪拌する。反応混合物を濾過し、濃縮し、ジエチルエーテル中で沈殿させる。濾過によって沈殿を回収し、真空下で乾燥させると、mPEG-SBA-30Kが得られる。

30

【0490】

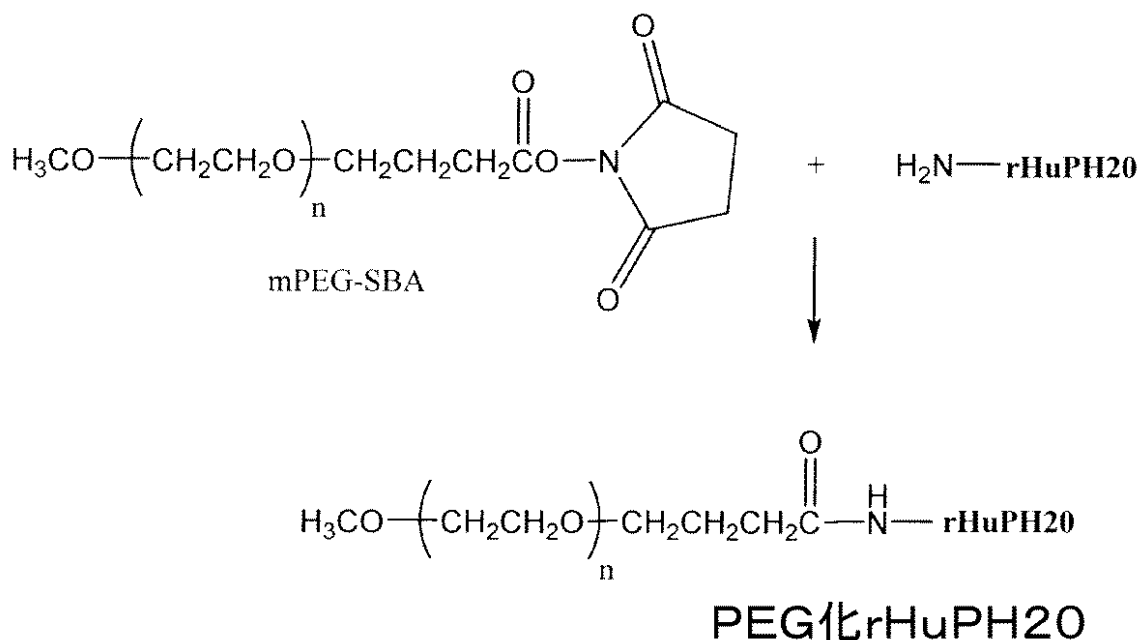
PEG化rHuPH20を製造するために、スキーム3に示されるように、mPEG-SBA-30Kを、共有結合コンジュゲーションによってrHuPH20のアミノ基（単数または複数）とカップリングし、rHuPH20およびmPEG間に安定なアミド結合を提供した。

40

スキーム3：

【0491】

【化 3】



10

【0492】

コンジュゲーションのために、mPEG-SBA-30Kを粉末形態でrHuPH20に加えた（130mM NaCl / 10mM HEPES；pH7中、10mg/mLの濃度で）。PEG：rHuPH20比は、10：1（モル比）であった。PEGがバッファに溶解された後、溶液を滅菌濾過した（Corning 50mL試験管トップフィルター、ポリスチレン、酢酸セルロース0.22μmメンブレン）。コンジュゲーションを、低温室中、4℃で攪拌しながら一晩実施した。

20

【0493】

コンジュゲーション後、溶液を100,000MWCO TFFメンブレンを使用して濃縮し、pH6.8の130mM NaCl / 10mM HEPESに対してバッファ交換した。上記の実施例2に記載されるように、酵素活性について調べられた得られた物質を、pH6.8の130mM NaCl / 10mM HEPESを使用して希釈すると、100,000U/mLの最終酵素活性（約2.5mgペプチド/mLに対応する）が得られた。このPEG化rHuPH20物質を濾過して1mLの容積にし、ブロムブチル（brombutyl）シールを備えた13-mm1型ガラスバイアルに入れ、凍結保存した（80℃のフリーザー中で一晩凍結し、次いで、長期保存には-20℃のフリーザー中に入れる）。

30

【0494】

B. PEG化rHuPH20の分析

PEG化rHuPH20物質を、ゲル電気泳動によってアッセイした。上記の実施例7Aにおいてと同様に製造したPEG化rHuPH20の3バッチは、未反応のPEGおよび異なる距離に移動した複数の種のmPEG-rHuPH20コンジュゲートに相当する、同一パターンの複数のバンドを示した。分子量マーカーの移動との比較に基づいて、種に相当するバンドは、約90KDa～300KDaの範囲であり、3つの濃いバンドは240KDaマーカーを超えて移動する。これらのデータは、mPEG-SBA-30Kの共有結合コンジュゲーションによって作製したPEG化rHuPH20は、おそらくは、モノー、ジマーおよびトリマーPEG化タンパク質含む、PEG化rHuPH20種の不均一な混合物を含んでいるということを示した。60KDaに眼に見えるバンドがないことは、すべてのタンパク質がPEGと反応してしまったこと、および混合物には検出可能な天然rHuPH20が存在しないということを示唆した。

40

【0495】

C. PEG化rHuPH20による、ヒアルロナンリッチな腫瘍細胞におけるヒアルロ

50

ナン特異的細胞周囲マトリックスH a l oの用量依存性低減

実施例6Aに記載されるものと同様のアッセイを用いて、ヒアルロナンリッチなヒト前立腺腫瘍癌腫（PC3）細胞における細胞周囲マトリックス（h a l o）の形成に対する種々の用量のPEG化rHuPH20の効果を評価した。このアッセイのために、PC3細胞の種々の低密度培養物を、細胞培地単独（対照；0）またはPEG化rHuPH20（上記の実施例2において記載される方法を使用して決定される、3、30、300、1000または3000のmLあたりの酵素ユニット（U/mL）で）を用いて、37℃で60分処理した。次いで、培養物を0.5mg/mLウシアグリカン（市販の；大きな凝集性コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）とともに37℃で60分間インキュベートした。

10

【0496】

HA（ヒアルロナン）タンパク質免疫組織化学（IHC）を使用して、培養物中のHAの量を可視化するために、細胞を、ビオチン標識ビオチン標識ヒアルロナン結合性タンパク質（HABP-bio）（Seikagaku, Japan）を用いて染色した。洗浄して、一次試薬を除去した後、FITC標識ストレプトアビジン（Vector Labs, Canada）を二次試薬として使用した。核を、DAPI（4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）試薬を使用して対比染色した。Insight FireWireデジタルカメラ（Diagnostic Instruments, Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。

20

【0497】

赤血球（RBC）粒子排除アッセイのために、各培養物に 5×10^6 個のホルマリン固定赤血球を加えた。粒子が落ち着いた後、培養物を100×倍率で視察した。細胞周囲マトリックスh a l oは、HAについてIHCによって陽性に染まる領域および粒子排除アッセイにおいて粒子（RBC）が排除される領域として同定した。

【0498】

「h a l o領域」は、HAについて陽性に染まるピクセル（免疫組織化学）またはRBCが排除される領域の mm^2 （粒子排除アッセイ）を測定することによって決定した。平均細胞面積を、各アッセイについて、それぞれ、ピクセルまたは mm^2 で同様に決定した。次いで、各サンプルの視野についてh a l o面積を平均細胞面積で除することによって「細胞面積あたりのh a l o面積」を導いた。次いで、ハロ対照サンプル（培地単独）の細胞あたりのh a l o面積を100%とし、1000U-PH20処理したヒアルロナンによって分解されたH460細胞の細胞あたりのh a l o面積（上記の実施例6Aに由来する）をゼロとして設定することによって「h a l oパーセント」を決定した。結果は、以下の表16に示されている。この表は、各研究条件（PEG化rHuPH20の用量）の平均「h a l oパーセント」を列挙し；各条件は、3連のウェル、ウェルあたりカウントされた25細胞で実施した（合計n=カウントされた75細胞）；平均の標準誤差（SEM）が示されている。データは、この研究におけるH a l oの低減におけるPEG化rHuPH20の最大半量有効濃度（ EC_{50} ）は、3.1U/mL（0.09 $\mu\text{g/mL}$ ）であると示した。75%最大有効濃度（ EC_{75} ）は、14.1U/mL（0.4 $\mu\text{g/mL}$ ）であった。

30

40

表16：PEG化rHuPH20で処理したヒアルロナンリッチな腫瘍細胞培養物におけるH a l o形成における用量依存性低減

【0499】

【表 16】

用量PEG-rHuPH20	% Halo	SEM
0	100	4.2
3	51.5	3.1
30	12.3	1.4
300	9.8	1.0
1000	4.8	0.6
3000	0	0.5

【0500】

10

D. PEG化rHuPH20は、*in vitro*でPC3細胞のコロニー増殖を阻害する

PEG化rHuPH20が、*in vitro*でヒアルロナンリッチな前立腺腫瘍細胞（PC3）の足場非依存性成長および増殖を阻害できるかどうかを調べるために、細胞で三次元クローン原性アッセイを実施した。約80%コンフルエンスのPC3細胞をトリプシン処理し、回収し、完全培地で1回洗浄した。細胞密度を 8×10^4 個/mLに調整し、氷上でMatrigel（登録商標）（BD Biosciences、San Jose、CA）に懸濁した。この細胞/Matrigel（登録商標）混合物の0.025 mLを、ウェルあたり0.1 mLでMatrigel（登録商標）を用いてプレコーティングされ、37℃で1時間固化されている48ウェル細胞培養プレートに播種した。連続曝露のために、17日間にわたって、APIバッファーおよび種々の濃度のPEG化rHuPH20を制御するために、0.6 mL/ウェルの、APIバッファー、1、3、10および100 U/mLのPEG化rHuPH20を含有する完全培地を適当なウェルの上部に加えた。ウェルを37℃、空气中、5% CO₂を含む加湿雰囲気中で17日間インキュベートし、必要に応じて、適当な濃度の酵素を含む新鮮処理培地を、17日の期間の間、3～4日毎に交換した。

20

【0501】

17日目に、Insight FireWireデジタルカメラ（Diagnostic Instruments、Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U倒立顕微鏡を用いて像を得ることによってコロニーの成長を評価した。コロニー数およびμmでの各コロニーの直径は、ImageJソフトウェア（像のディスプレイおよび解析のための、面積およびピクセル値を算出するための、オープンソースソフトウェア、公的に入手可能なプログラム）および連動する較正機能を使用して測定した（コロニー容積は、コロニー直径を使用して、および式： $4/3\pi r^3$ を使用して算出した）。

30

【0502】

各条件についてウェルの平均コロニー容積を求め、対照サンプル（酵素を含まないAPI（活性な薬剤成分）バッファー（10 mM Hepesおよび130 mM NaCl、pH 7.0））対PEG化rHuPH20の存在下でインキュベートされたサンプルにおける平均コロニー容積を比較することによって、PEG化rHuPH20の、コロニー容積に対する効果を評価した。次式：

40

$$\left(\text{対照の平均容積} - \text{処理の平均容積} \right) / \left(\text{対照の平均容積} \right) \times 100$$
を使用して阻害割合を算出した。

【0503】

PEG化rHuPH20は、対照と比較して小さいコロニー容積によって明らかな、成長の用量依存性阻害を誘導した。上記の式を使用して算出した阻害割合に基づいて、1、3、10および100 U/mLのPEG化rHuPH20の存在下でインキュベートした培養物は、対照バッファーとともにインキュベートされた培養物と比較して、それぞれ、39%、67%、73%および75%のコロニー容積の平均低減を示した（3 Uおよび10 Uサンプルについて $p < 0.01$ ；100 Uサンプルについて $p < 0.001$ ； $n = 6$ ）。

50

）。統計的差異は、Mann-Whitney検定を使用して分析した。

【0504】

Graphpad Prism（登録商標）4プログラム（GraphPad ソフトウェア、Inc.、La Jolla、CA）を使用して求めた、コロニー容積の低減におけるPEG化rHuPH20のIC₅₀は、約1.67 U/mLであった。ビヒクル処理（対照）培養物では、コロニーの平均数は、ウェルあたり10.17±1.56であり、PEG化rHuPH20 100 U/mLで処理した培養物では、ウェルあたり11.50±0.89であった。コロニー数の相違は、対照と100 U/mL培養物の間で有意ではなかった（n=6、p>0.05）。これらの結果は、PEG化rHuPH20は、ヒアルロナンの豊富な癌細胞の増殖および／または生存を阻害できることを示す。

10

【実施例8】

【0505】

PEG化rHuPH20：天然rHuPH20と比較したin vivo作用期間の増大

A. 天然rHuPH20およびPEG化rHuPH20の薬動学的の評価

1. 天然rHuPH20の薬動学的の評価

Charles River Laboratoriesから90匹の雄のCD-1マウスを入手した。動物は、無作為化の当日に、約3～5週齢のものであり、約17～23グラムの重量であった。0.398 mg/kg HUA（ロット番号HUA0703MA；実施例3に記載されるGen1製造を使用して作製した）または0.433 mg/kg HUB（ロット番号HUB0702CA；実施例4に記載されるGen2製造を使用して作製した）rHuPH20のいずれかの尾静脈注射（静脈内の）によって動物に投与した。静脈内注射は、約30秒かかる緩やかな圧力によって行った。PH20（HUAまたはHUB）を用いて投与した6匹の動物を、血液採取のために、投与前に、投与後1、5、10、30分にならびに1、2および3時間に麻酔／安楽死させた。血漿サンプルを採取し、rHuPH20濃度測定まで凍結保存した。

20

【0506】

96ウェルプレートベースの酵素アッセイを使用してrHuPH20の血漿濃度を調べた。酵素アッセイは、血漿試料または組織ホモジネート中のrHuPH20含量の尺度を提供する、Frost et al. (1997)によって記載される方法(A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents. Analytical Biochemistry (1997) 251:263-269)の改変である。最初に、ビオチン化HA（bHA）基質をプラスチック製マイクロタイタープレートと結合させた。標準および試料中に存在するrHuPH20を、これらのbHAコーティングされたプレート中、最適条件下、37℃で約90分間インキュベートした。酵素反応を停止した後、残存する結合しているbHAを、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートを60分間最初に加えること、次いで、続いて、TMB基質を使用して反応を可視化することによって検出した。標準またはサンプル中にrHuPH20が多いほど、より少ないSA-HRPと結合するのに利用可能なbHAにつながるの、光学濃度（450 nm）値は、各検体中のヒアルロニダーゼ活性の濃度と反比例していた。アッセイ範囲は、約0.013～1 U/mLであった。50倍サンプル希釈係数について、LLOQは、約0.625 U/mLであった。したがって、サンプルの1:100希釈を用いる、アッセイの定量化の下限（LLOQ）は、0.625 U/mLの酵素であった。薬物動態（PK）分析は、WinNonlin Proバージョン5.1（Pharsight Corp.、Mountain View、CA.）を使用して実施した。PKパラメータは、非区画化法を使用して導いた。要約統計量は、EXCEL（Microsoft Corp.、Seattle、WA）またはJMP v. 5.0.1（SAS Institute、Cary、NC.）を使用してコンピュータで計算した。ANOVAは、JMP v. 5.0.1を使用して実施した。

30

40

【0507】

rHuPH20（HUAおよびHUB）のピーク血漿濃度は、IV注入の開始の際、直

50

ちに得た（1分の採取時間で）。HUAおよびHUBの平均ピーク濃度（ C_{max} ）は、それぞれ、1148および1176 ng/mLであった。ピーク濃度の減少は、HUAおよびHUBの両方について迅速であり、二相性であった。投薬後1から5分の間の初期分布相に、わずかに遅い排出相が続いた。血漿濃度は、投薬後30分までに、アッセイ定量化限界（0.625 U/mL）より低く低下した。IV注射からの終末期半減期（ $t_{1/2\lambda z}$ ）は、HUAについて0.045時間（2.6分）であり、HUBについて0.038時間（2.3分）であった。短い半減期は、雄のCD-1マウスにおけるrHuPH20の迅速な排出を表した。

【0508】

2. PEG化rHuPH20の薬動学的の評価

雄のIRCマウス（Harlan）において単回用量PK研究を実施して、2ロットのPEG化rHuPH20（PEGPH20）；ロット2005-9-14（比活性38,000 U/mg）およびロット221-092（比活性32,000 U/mg）について血漿濃度対時間プロファイルを特性決定し、比較した。さらに、反復Monday-Thursday BIW（1週間に2回）IV注射後のPK濃度を、1研究群の動物で調べた。

【0509】

PEGPH20（実施例7Aに記載のとおり製造された）を、25 gを超える重量の雄のIRCマウスに静脈内投与した；IV用量は、125,000の体重1キログラムあたりのヒアルロニダーゼ活性ユニット（U/kg）とした。投薬前および投薬後所定の時間で血液サンプルを採取した。マウスの制限された血液容積のために、連続血液採取のために低密度サンプリングスキームを使用した。研究動物の無作為化および低密度血液採取時間は、表16Aに示されている。

【0510】

10

20

【表 17】

表16A:無作為化および低密度血液採取スキーム				
群	N/群	試験品	用量	血液採取のための時点
1	3	PEGPH20 ロット番号221-092	125,000 U /kg	5分、30分、1時間、24時間
2	3	PEGPH20 ロット番号2005-9-14	125,000 U /kg	5分、30分、1時間、24時間
3	3	PEGPH20 ロット番号221-092	125,000 U /kg	1時間、2時間、4時間、24時間
4	3	PEGPH20 ロット番号2005-9-14	125,000 U /kg	1時間、2時間、4時間、24時間
5	3	PEGPH20 ロット番号221-092	125,000 U /kg	前、4時間、8時間、24時間
6	3	PEGPH20 ロット番号2005-9-14	125,000 U /kg	4時間、8時間、24時間
7	3	PEGPH20 ロット番号2005-9-14	用量あたり125,000U/kg	1時間、4時間、24時間、48時間、72時間-最初の用量 1時間、4時間、24時間、48時間、96時間-第2の用量 1時間、4時間、24時間、48時間-第3の用量

10

20

30

【0511】

採取した血液サンプルから血漿を調製し、 -70°C で分析まで凍結保存した。実施例2に記載されるマイクロ濁度マイクロタイタープレートベースのアッセイによって各血漿サンプル中のヒアルロニダーゼ活性を調べた。アッセイの定量化の下限は、 2.90 U/mL であった。血漿濃度対時間データを、WinNonlin Proバージョン5.1 (Pharsight Corp.、Mountain View、CA)を使用して非コンパートメントおよびコンパートメント法によって分析した。導かれたPKパラメータは、AUC、CmaxおよびTmaxを含んでいた。これらのパラメータを、2ロットのPEGPH20間で比較して、PK比較性を評価した。 U/mL から $\mu\text{g/mL}$ の変換のために $35,000\text{ U/mg}$ の一般的な比活性を使用した。 $35,000\text{ U/mg}$ は、2ロットのPEGPH20 (ロット221-092および2005-9-14)の比活性の平均であった。

40

【0512】

AUCおよびCmaxによって定義される全身曝露は、マウスに静脈内に投与された場合に2ロットのPEGPH20間で同様であった。2ロットから得た一般的なPKプロフィールも、同様であり、約10～11時間の長期の消失半減期および 10 mL/hkg 未満の遅い全身クリアランスを有していた。血液採取時間による平均および中央値血漿濃度の統計的比較は、2ロットのPEGPH20間で有意な相違を示さなかった。合計3用

50

量のPEGPH20の反復BIW（月曜－木曜）IV投与によって、第1の用量の薬物動態学によって予測できる予想される血漿濃度が得られた。これらの結果は、PEG化rHuPH20は、静脈内注射による投与後に、持続されたin vivo酵素活性を有し、半減期の約250倍を超える増大を有するということを示唆した。

【0513】

B. ヒアルロナンリッチな腫瘍モデルにおける（脛骨周囲PC3前立腺癌腫異種移植片モデル）におけるIn Vivo活性

静脈内投与後のPEG化および天然rHuPH20の効果を比較するために、実施例6に記載される脛骨周囲PC3前立腺癌腫異種移植片モデル動物を、天然およびPEG化rHuPH20を用いて治療した。

【0514】

1. PEG化rHuPH20の投与後の血漿におけるヒアルロニダーゼ酵素活性の期間の増大

2群の脛骨周囲PC3前立腺癌腫異種移植片モデル動物（PC3ヒト前立腺癌異種移植片を有する胸腺欠損雄；上記の実施例6参照）に、それぞれ、10,000ユニットのPEG化rHuPH20（実施例7Aに記載されるとおりに製造した）および天然rHuPH20を用いて静脈内注射した。

【0515】

10,000ユニットの天然rHuPH20／PEG化rHuPH20の投与に先立って、投与後の種々の時点で、動物から血液を採取した。血漿を調製し、上記の実施例2に記載される酵素活性測定法を使用して、これらの時点での1mLの血漿あたりのrHuPH20活性の単位を調べた。結果は、天然rHuPH20の投与後の血漿における酵素活性の半減期は、1分未満である（この実験では、血漿半減期は、0.59分であった）ということを示した。天然rHuPH20の投与後10分までに、血漿1mLあたり5未満の酵素ユニットしか観察されなかった。

【0516】

対照的に、PEG化rHuPH20は、24時間を超える血漿酵素半減期を示した。10,000酵素ユニットのPEG化rHuPH20の投与後60分で、血漿1mLあたり1000を超える酵素活性ユニット（注射されたものの10%を超える）が観察された。これらの結果は、PEG化rHuPH20は、静脈内注射による投与後、持続したin vivo酵素活性を有し、半減期の2000倍を超える増大を有するということを示唆した。

【0517】

2. PEG化rHuPH20を用いる、遠位腫瘍におけるヒアルロナン低減期間の増大
天然／PEG化rHuPH20投与の前、投与後45分、2時間、24時間、48時間および72時間に、上記の実施例8B.1に記載されるマウスから脛骨周囲腫瘍を採取し、規定濃度の緩衝ホルマリン（NBF）中で固定した。腫瘍中のヒアルロナン（HA）のレベルを、免疫組織化学（IHC）によって評価した。IHCのために、5μmの腫瘍切片をビオチン標識ヒアルロナン結合タンパク質（HABP-bio）（Seikagaku, Japan）を使用して染色した。洗浄して一次試薬を除去した後、FITC標識したストレプトアビジン（Vector Labs, Canada）を、二次試薬として使用した。核を、DAPI（4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）試薬を使用して対比染色した。Insight FireWireデジタルカメラ（Diagnostic Instruments, Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。

【0518】

rHuPH20投与の前の、強い緑色の染色は、腫瘍中のHAの存在を示した。10,000ユニットの天然rHuPH20の静脈内投与の45（45）分後、腫瘍は、眼に見えるHA染色を示さなかった。しかし、24時間内に、腫瘍中のHAレベルは、投与前に観察されたものへ回復したと思われ、迅速なヒアルロナンターンオーバーおよび天然rH

10

20

30

40

50

u P H 2 0 の短い半減期と一致する。しかし、P E G 化 r H u P H 2 0 の投与後、H A 染色は、投与後 2 時間、4 8 時間で、7 2 時間でも観察されなかった。これらの結果は、P E G 化 r H u P H 2 0 の静脈内投与は、腫瘍部位で持続した酵素活性を投与後少なくとも 7 2 時間もたらすということを示唆した。

【0519】

3. P E G 化 r H u P H 2 0 による遠位腫瘍における H A 分解の用量反応

別の研究では、脛骨周囲 P C 3 前立腺癌腫異種移植片モデル動物のさらなる群中の動物を、ビヒクルおよび種々の量濃度（マウスあたり 1 0、1 0 0、5 0 0、1 0 0 0 および 1 0、0 0 0 酵素ユニット（U））の P E G 化 r H u P H 2 0 を用いて治療した。この治療の 3 日（7 2 時間）後、マウスから脛骨周囲腫瘍を採取し、規定濃度の緩衝ホルマリン（N B F）中で固定した。上記の実施例 8 B. 2 に記載されるとおり、腫瘍中のヒアルロナン（H A）のレベルを、免疫組織化学（I H C）によって評価した。腫瘍切片でヘマトキシリン／エオシン（H & E）染色も行った。結果は、1 0 0、5 0 0、1 0 0 0 および 1 0、0 0 0 U の P E G 化 r H u P H 2 0 を用いて治療した動物から得た腫瘍切片における H A 染色の用量依存性低減を示した。1 0 0 0 および 1 0、0 0 0 U の P E G 化 r H u P H 2 0 を投与されている動物から得た切片では、眼に見える染色はほとんど観察されなかった。5 0 0 U の P E G 化 r H u P H 2 0 を投与された動物の切片では、弧発性染色が観察され、このことは、この例示的研究では、H A 染色は、5 0 0 U を超える（この場合には、1 0 0 0 U）用量を用いる場合にのみ完全に除去されるということを示す。これらの結果は、P E G 化 r H u P H 2 0 の単回全身投与は、遠位腫瘍においてヒアルロナンを少なくとも 3 日間低減し得るということを示した。この研究では、P E G 化 r H u P H 2 0 の E D₅₀（H A 染色の 5 0 % 低減を誘発する用量）は、キログラムあたり 1 3、0 0 0 の酵素ユニット（U / K g）であり、これは、約 3 0 0 μ g / K g に相当する。

【0520】

4. 遠位 P C 3 腫瘍からの H A の P E G 化 P H 2 0 除去の作用期間

さらなる研究では、P C 3 前立腺腫瘍モデル動物を、ビヒクルを用いて 1 0 日間、またはマウスあたり 1 0、0 0 0 U（約 1 5 m g / K g）の P E G 化 r H u P H 2 0 を用いて 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 1 0 日間治療した。治療後、上記の実施例 8 B. 2 に記載されるように、マウスから脛骨周囲腫瘍を採取し、規定濃度の緩衝ホルマリン（N B F）中で固定し、免疫組織化学によってヒアルロナン（H A）発現について評価した。H A 染色は、すべての時点で減少し、5 日目から H A 染色の可視的検出はなかった。

【実施例 9】

【0521】

P E G 化 r H u P H 2 0 を用いる持続した I F P 抑制

A. P E G ・ r H u P H 2 0 投与は、腫瘍 I F P において迅速な、持続した用量依存性低減をもたらす。

遠位腫瘍 I F P に対する、P E G 化 r H u P H 2 0（P E G r H u P H 2 0）および天然 r H u P H 2 0 の全身投与の効果を比較するために、上記の実施例 6 B に記載される方法を使用して、P C 3 異種移植片モデル動物における種々の量の各酵素の静脈内注射後の腫瘍 I F P を測定した。

【0522】

第 1 に、群あたり、各々、P E G r H u P H 2 0 または天然 r H u P H 2 0 いずれかの 1 0、0 0 0 ユニット用量を投与されている 3 匹のマウスを使用して、腫瘍 I F P の低下を比較した。上記の実施例 6 B に記載されるように、天然 r H u P H 2 0 の投与を用いると、腫瘍 I F P は、投与後 1 0 分で平均 3 4 % まで低下し、1 時間で 6 1. 3 % まで低下した。1 0、0 0 0 ユニットの P E G r H u P H 2 0 の投与は、注射後最初の 1 0 分で同様の（2 2. 4 %）低減をもたらした。しかし、投与後 1 時間までに、P E G r H u P H 2 0 は、遠位腫瘍 I F P を、ベースラインと比較して平均 8 8. 6 % まで低減し、このことは、P E G 化可溶性ヒアルロニダーゼは、天然酵素と比較して、I F P に対して増

大した、および／または持続した効果を有することを示す。

【0523】

次いで、間質液圧に対する rHuPH20 の効果が用量依存性であったかどうかを調べるために、10 群の PC3 異種移植片マウス（群あたり 7 匹のマウス）を使用して上記の実施例 6 B に記載される方法を実施し、各群は、100、1000、3000、7000（PEG 化 rHuPH20 のみ）または 10,000 ユニットの PEG 化もしくは天然 rHuPH20 を用いて、上記のように治療され、または対照担体バッファーを尾静脈注射によって静脈内に投与した。IFP を、投与前、投与の間および投与後連続して測定した。IFP は、投与後 120 分まで測定した。

【0524】

結果は、天然および PEG 化 rHuPH20 両方の静脈内投与は、遠位腫瘍 IFP を用量依存的に低減させるということを示した。PEG 化 rHuPH20 の数回の用量は、投与後 1 および 2 時間までに IFP のより大きな低減をもたらした。例えば、この例示的実験では、1000 ユニットの天然 rHuPH20 の投与は、120 分後、腫瘍 IFP の約 30 % の低減をもたらした（対照と比較しておよそ 70 %）が、同用量（1000 ユニットの PEG 化 rHuPH20 の投与は、腫瘍 IFP を 50 % 超まで低減させた（対照のおよそ 48 %）。最高用量（3,000～10,000 U/マウス）の PEG 化 rHuPH20 での IFP 低減は、120 分で 80 % を超えていた。IC₅₀（PEG 化 rHuPH20 治療後 120 分での IFP 阻害 % の）は、807.6 U/マウスであった。3 種の最高用量（3000、7000 および 10,000 U の PEG 化 rHuPH20/マウス）効果は、この時点で横ばい状態になると思われた。

【0525】

B. PEG 化 rHuPH20 の静脈内投与は、長期の腫瘍 IFP 抑制をもたらす

実施例 8 において観察される、PEG 化 rHuPH20 による in vivo 活性期間の増大が腫瘍 IFP の長期の抑制に変換されるかどうかを調べるために、PC3 異種移植片モデル動物（群あたり 4 匹の動物）の群に、上記のように、担体バッファーまたは 10,000 ユニットの PEG 化 rHuPH20 を静脈内注射し、実施例 6 B に記載されるように、投与後 8 時間、24 時間、48 時間および 72 時間で IFP を測定した。

【0526】

同様の実験は、遠位腫瘍 IFP は、天然 rHuPH20 の投与後 24 時間までに対照レベルに戻ったことを示した。対照的に、この実験では、IFP は、10,000 ユニットの PEG 化 rHuPH20 の単回用量の静脈内投与後、8 時間、24 時間および 48 時間で少なくとも約 50 % 低下した。この実験では、平均腫瘍 IFP は、72 時間までに対照レベルに近づいた。これらの結果は、PEG 化 rHuPH20 を、静脈内に投与して、遠位腫瘍部位で長期の間質液圧低下を達成できるということを示す。

【0527】

C. PEG 化 rHuPH20 投与による腫瘍 IFP の低下は、HA 依存性である

PEG 化 rHuPH20 による腫瘍 IFP の低下が、腫瘍中のヒアルロン酸（HA）の存在に依存していたことを実証するために、5 種の異なる腫瘍モデルにおいて IFP に対する効果を評価した。この研究のために、雄胸腺欠損ヌード（nu/nu）マウスに、適当な細胞株：PC3（上記、例えば、実施例 6 に記載される）；BxPC3（ヒト膵臓癌腫細胞株）；Mat Ly Lu（Dunning シリーズのラット前立腺癌腫に由来するラット前立腺癌腫）；Du145（ヒトホルモン不応性前立腺癌腫細胞株）；および NC IH460（ヒト大細胞肺癌腫細胞株）を用いて、PC3 モデルについて記載されるように、後肢において、脛骨周囲に接種することによって、各腫瘍モデルの動物の群を作製した（上記の実施例 6 参照）。

【0528】

以下の実施例 17 に記載されるように、これらのマウスから単離された腫瘍を、HA 発現の程度の相違について免疫組織化学（IHC）によって評価した。IHC を、腫瘍から得た切片で実施し、「+++」スコアが、視野の 80 % 超における強い染色を示し、「+

10

20

30

40

50

／－」が、薄い染色を示し、「－」が眼に見える染色がないことを示す採点システムを使用した。以下の実施例 17 に、および表 17 に記載されるように、この研究は、+++ から＋／－の範囲の腫瘍中の H A レベルの範囲を示した。

【0529】

400 から 800 mm³ の間に達した腫瘍を有する、P C 3 前立腺腫瘍モデル、B x P C 3 膀胱癌腫瘍モデル、M a t L y L u 前立腺腫瘍モデル、D u 1 4 5 ヒト前立腺腫瘍モデルおよび N C I H 4 6 0 肺癌腫モデルからの動物に、15 mg / K g（マウスあたり 10, 000 U）P E G 化 r H u P H 2 0 または対照バッファー（酵素を含まない A P I（活性な薬剤成分）バッファー（10 mM H e p e s および 130 mM N a C l、p H 7. 0））を用いて静脈内注射した。以下の実施例 17 A に記載されるように決定される、これらのモデルの各々における腫瘍 H A の相対量が、以下の表 17 に示されている。

10

【0530】

I F P を、上記の実施例 6 B に記載のとおり、投与前、投与の間および投与後連続して測定した。I F P は、投与後 120 分まで測定した。以下の表 17 は、各腫瘍モデルの、120 分での I F P のおよその相対的低減（対照バッファーを用いる治療と比較して）を示す。これらの数字について、P E G 化 r H u P H 2 0 を投与された動物における I F P を、対照バッファーを投与されている動物におけるものと比較した。結果は、P E G 化 r H u P H 2 0 静脈内投与は、遠位腫瘍において I F P を H A 依存的に低下させるということを示す。

20

表 17：P E G 化 r H u P H 2 0 による腫瘍 I F P の低下は、腫瘍中の H A 量に応じて変わる

【0531】

【表 18】

腫瘍モデル	相対腫瘍HA	およその相対IFP低下
PC3	+++	84 %
BxPC3	+ / +++	30 %
Mat LyLu	+	25 %
Du145	+ / -	19 %
NCI H460	+ / -	16%

30

【実施例 10】

【0532】

r H u P H 2 0 の静脈内投与は、遠位腫瘍における血管容積の増大をもたらす（P E G 化 r H u P H 2 0 を用いる持続した効果）

横断二次元超音波画像診断を使用して、上記の実施例 6 に記載される異種移植片モデルにおける脛骨周囲腫瘍における r H u P H 2 0 投与の前後で血管容積を測定した。

【0533】

V i s u a l S o n i c s V e v o 770（登録商標）高解像度超音波（U / S）（V i s u a l S o n i c s、I n c.、T o r o n t o、O n t a r i o、C a n a d a）をコントランスモードで使用し、腫瘍中の血管容積の相対的測定値を得た。コントランスモード画像獲得の際、血管腔に捕捉されていないが、その大きさによって捕捉されるようになる、非標的化室素／ペルフルオロブタン充填 M i c r o M a r k e r（登録商標）マイクロバブル（M B）（V i s u a l S o n i c s、I n c.）を尾静脈注射によって静脈内に投与した。M B は、ハイパーエコーを示し、従って、強い超音波反射を提供し、また 2. 3 ～ 2. 9 mm の中央径を有する。したがって、M B は、注射後、血管区画に閉じ込められる。相対血管容積は、以下の方程式を使用して、注目する腫瘍領域（R O I）あたりの、M B 注射後の超音波シグナル強度（B）－M B 注射前の超音波シグナル強度（A）として算出した：

40

50

$$\text{血管容積}(\tau 1) = [(B - A) / ROI]$$

【0534】

相対血管容積の変化は、以下の方程式のように、2時点（例えば、rHuPH20の投与の前後）での血管容積の相違（上記の方程式を用いて算出される）であった：

$$\text{血管容積の変化} = \text{血管容積}(\tau 2) - \text{血管容積}(\tau 1)$$

【0535】

これらの方法を使用して、脛骨周囲腫瘍中の血管容積を、上記の実施例6および9に記載されるように可溶性ヒトヒアルロニダーゼ（天然またはPEG化）の異種移植片モデル動物への静脈内投与後8時間、24時間、48時間および72時間で測定した。天然rHuPH20の投与後8および24時間で、遠位腫瘍血管容積は、担体バッファー単独の注射後よりも2から2.5倍の間、高かった。しかし、PEG化rHuPH20の投与後8および24時間で、血管容積は、バッファー単独の注射後よりも3から4倍の間、高かった。PEG化rHuPH20の投与後48時間までに、腫瘍血管容積は、バッファー単独を用いる注射後に観察された血管容積と比較して依然として3倍増大していた。これらの結果は、PEG化rHuPH20の全身投与は、腫瘍血管の持続した「酵素的減圧」を達成でき、これが血管容積の増大をもたらすということを示す。

【0536】

腫瘍血管の酵素的減圧はまた、血管の可視化のために免疫組織化学（IHC）によっても評価した。担体バッファーまた10,000ユニットのPEG化rHuPH20で治療された群から得た（3匹のPC3異種移植片モデル動物各々の）脛骨周囲腫瘍を、採取し、ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。血管の検出のために、腫瘍から得た切片を、ラット抗マウスCD31抗体（PharMingen、San Diego）を使用して染色した。一次抗体を洗浄した後、HRPがコンジュゲートしているウサギ抗ラットIgG（ベクターLabs、Canada）を用いて切片を染色した。二次抗体を洗浄した後、DAB基質を使用して、CD31染色を可視化した。ヘマトキシリンを用いて核を対比染色した。ImageJオープンソースソフトウェア、像のディスプレイおよび解析のための、面積およびピクセル値を算出するための、公的に入手可能なプログラムを使用して微小血管面積を定量化した。この場合には、プログラムを使用して、CD31陽性微小血管の内側の面積を測定した。結果は、対照治療動物から得た腫瘍切片において約200平方マイクロメートル（ μm^2 ）の平均CD31+微小血管面積、および48時間前にPEG化rHuPH20の静脈内用量を投与されたマウスから得た腫瘍切片において約700 μm^2 の平均CD31+微小血管面積を示した。この3倍を超える増大は、PEG化rHuPH20の投与は、腫瘍血管の持続した酵素的減圧達成するという知見を支持した。

【実施例11】

【0537】

PEG化rHuPH20の静脈内投与は、腫瘍水分含量の持続した低減をもたらす

10,000ユニットのPEG・rHuPH20または担体バッファー単独の、上記の実施例において記載されるような、静脈内投与後、種々の時点で、PC3異種移植片動物の群（群あたり9匹のマウス）で腫瘍水分含量を測定した。水分含量を投与後2、8、24、48、72、96および120時間に測定した。

【0538】

水分含量を測定するために、PC3腫瘍片を採取し、吸い取り、秤量し、スナップ凍結した。続いて、サンプルを凍結乾燥機に入れ、48時間にわたって乾燥させ、秤量した。水分重量は、組織湿重対乾重比として報告された。結果は、測定されたすべての時点で、PEG・rHuPH20を投与されたマウスでは、担体バッファー注射を投与されている動物と比較して、湿重／乾重比は有意に低下する（ $p < 0.05$ ）ということを示した。

【0539】

相対H2O拡散率（ADC）—動物に、天然rHuPH20、PEG・rHuPH20または担体バッファーを投与し、拡散加重MRIを経時的に測定し、見かけの拡散係数（

A D C) を決定した (例えば、Park MJ et. al, Korean J Radiol. 2007 (5):390-6、The role of diffusion-weighted imaging and the apparent diffusion coefficient(ADC) values for breast tumors参照)。ADC値は、腫瘍水分含量を反映していた。投与後 48 および 72 時間の両方で、P E G・r H u P H 2 0 治療後の平均 H 2 O 見かけ拡散係数 (A D C) は、担体バッファー単独での治療と統計的に異なっていた。水 A D C の低下は、P E G 化 r H u P H 2 0 によって静脈内に治療された動物中の腫瘍における水拡散／並進運動の低減を反映していた。したがって、水拡散は、対照と比較して、48 および 72 時間の両方でこれらの動物中の腫瘍において有意に低減した。この結果は、P E G 化 r H u P H 2 0 の静脈内投与後、少なくとも 72 時間、間質容積割合が低減したこと、および／または間質液の蛇行が減少したことを示す。

10

【実施例 12】

【0540】

シアル酸および単糖含量の決定

可溶性 r H u P H 2 0 のシアル酸および単糖含量を、トリフルオロ酢酸を用いる加水分解後の逆相液体クロマトグラフィー (R P L C) によって評価できる。一実施例では、精製されたヒアルロニダーゼロット番号 H U B 0 7 0 1 E (1.2 mg/mL; 本質的に実施例 5 に記載のとおり製造および精製された) のシアル酸および単糖含量を決定した。手短には、100 μg サンプルは、2 連で 100 °C で 4 時間 40 % (v/v) トリフルオロ酢酸を用いて加水分解した。加水分解後、サンプルを乾燥させ、300 μL の水に再懸濁した。再懸濁したサンプルの各々から 45 μL のアリコートをし、新しい試験管に移し、乾燥させ、各々に 10 mg/mL 酢酸ナトリウム溶液 10 μL を加えた。放出された単糖を、メタノール中、30 mg/mL の 2-アミノ安息香酸、20 mg/mL 水素化シアノホウ素ナトリウム、約 40 mg/mL 酢酸ナトリウムおよび 20 mg/mL ホウ酸を含有する溶液 50 μL を添加することによって蛍光標識した。混合物を、80 °C 暗所で 30 分間インキュベートした。移動相 A (0.2 % (v/v) n-ブチルアミン、0.5 % (v/v) リン酸、1 % (v/v) テトラヒドロフラン) 440 μL の添加によって、誘導体化反応をクエンチした。陰性対照として水のマトリックスブランクも、ヒアルロニダーゼサンプルについて記載されるように加水分解し、誘導体化した。放出された単糖を、オクタデシル (C₁₈) 逆相カラム (4.6 × 250 mm、5 μm 粒径; J. T. Baker) を使用する R P L C によって分離し、蛍光検出 (360 nm 励起、425 nm 発光) によってモニタリングした。単糖含量の定量化は、ヒアルロニダーゼサンプルから得たクロマトグラムを、N-D-グルコサミン (GlcN)、N-D-ガラクトサミン (GalN)、ガラクトース、フコースおよびマンノースを含めた単糖標準のクロマトグラムと比較することによって行った。表 18 は、ヒアルロニダーゼ分子あたりの各単糖のモル比を示す。

20

30

表 18. 可溶性 r H u P H 2 0 の単糖含量

【0541】

【表 19】

ロット	複写物	GlcN	GalN	ガラクトース	マンノース	フコース
HUB070 1E	1	14.28	0.07*	6.19	25.28	2.69
	2	13.66	0.08*	6.00	24.34	2.61
	平均	13.97	0.08*	6.10	24.81	2.65

40

* G a l N 結果は、検出限界より低かった

【実施例 13】

【0542】

3 D 3 5 M および 2 B 2 細胞から得た可溶性 r H u P H 2 0 の C 末端不均一性

C 末端配列決定を、100 L のバイオリアクター容量中の 3 D 3 5 M 細胞 (ロット H U

50

A 0 5 0 5 M A) および 3 0 0 L のバイオリアクター容量中の 2 B 2 細胞 (ロット H U B 0 7 0 1 E B) から製造し、精製した 2 ロットの s H u P H 2 0 で実施した。これらのロットを、N 末端でアスパラギン酸およびシステイン酸でペプチド結合を特異的に切断する、エンドプロテアーゼ A s p - N を用いて別個に消化した。これによって、配列番号 4 の位置 4 3 1 のアスパラギン酸で可溶性 r H u P H 2 0 の C 末端部分が放出される。C 末端断片を分離し、特性決定して、ロット H U A 0 5 0 5 M A およびロット H U B 0 7 0 1 E B 中の各集団の配列および存在量を決定した。

【 0 5 4 3 】

3 D 3 5 M 細胞および 2 B 2 細胞から得た可溶性 r H u P H 2 0 調製物は、不均一性を示し、その C 末端配列において互いに異なっているポリペプチドを含むということが観察された (表 1 9 および 2 0) 。この不均一性は、製造および精製工程の間の、細胞培養培地またはその他の溶液中に存在するペプチダーゼによる、発現された 4 4 7 個のアミノ酸のポリペプチド (配列番号 4) の C 末端切断の結果である可能性が高い。可溶性 r H u P H 2 0 調製物中のポリペプチドは、配列番号 4 に示される可溶性 r H u P H 2 0 配列のアミノ酸 1 ~ 4 4 7 、 1 ~ 4 4 6 、 1 ~ 4 4 5 、 1 ~ 4 4 4 および 1 ~ 4 4 3 に対応するアミノ酸配列を有する。これらのポリペプチド各々の全長アミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 4 ~ 8 に示されている。表 1 9 および 2 0 に記載されるように、3 D 3 5 M 細胞および 2 B 2 細胞から得た可溶性 r H u P H 2 0 調製物中の各ポリペプチドの存在量は異なる。

表 1 9 . ロット H U A 0 5 0 5 M A から得た C 末端断片の分析

【 0 5 4 4 】

【 表 2 0 】

断片	アミノ酸位置 (配列番号4と比較して)	配列	理論上の質量	実験的質量	誤差	溶出時間	存在量
D28 a	431-4 47	DAFKLPPMETEEPQIFY (配列番号57)	2053. 97	2054. 42	0.45	99.87	0.2%
D28 b	431-4 46	DAFKLPPMETEEPQIF (配列番号58)	1890. 91	1891. 28	0.37	97.02	18.4%
D28 c	431-4 45	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO 59)	1743. 84	1744. 17	0.33	86.4	11.8%
D28 d	431-4 44	DAFKLPPMETEEPQ (配列番号60)	1630. 70	1631. 07	0.32	74.15	56.1%
D28 e	431-4 43	DAFKLPPMETEEP (配列番号61)	1502. 70	1502. 98	0.28	77.36	13.6%
D28 f	431-4 42	DAFKLPPMETEE (配列番号62)	1405. 64	ND	N/A	N/A	0.0%

表 2 0 . ロット H U B 0 7 0 1 E B から得た C 末端断片の分析

【 0 5 4 5 】

【表 2 1】

断片	アミノ 酸位置 (配列 番号4 と比較 して)	配列	理論上 の質量	実験的 質量	誤差	溶出時 間	存在量
D28a	431-4 77	DAFKLPPMETEEPQI FY (配列番号57)	2053. 97	2054. 42	0.45	99.89	1.9%
D28b	431-4 46	DAFKLPPMETEEPQI F (配列番号58)	1890. 91	1891. 36	0.45	96.92	46.7%
D28c	431-4 45	DAFKLPPMETEEPQI (配列番号59)	1743. 84	1744. 24	0.40	85.98	16.7%
D28d	431-4 44	DAFKLPPMETEEPQ (配列番号60)	1630. 70	1631. 14	0.39	73.9	27.8%
D28e	431-4 43	DAFKLPPMETEEP (配列番号61)	1502. 70	1503. 03	0.33	77.02	6.9%
D28f	431-4 42	DAFKLPPMETEE (配列番号62)	1405. 64	ND	N/A	N/A	0.0%

10

20

【実施例 1 4】

【0 5 4 6】

前立腺癌モデルにおける静脈内投与後のPEG化rHuPH20および細胞傷害性薬剤の抗腫瘍効果

PEG化rHuPH20ならびに細胞傷害性薬剤ドセタキセル（タキソテール（登録商標）；Sanofi Aventis）およびリボソームドキシソルビシン（ドキシル（登録商標）；Ortho Biotech）の同時投与の抗腫瘍効果を、ホルモン不応性前立腺癌異種移植片モデルおよび骨転移モデルを使用して評価した

A. 前立腺癌異種移植片モデル

PC3脛骨周囲ホルモン不応性前立腺癌異種移植片モデルを確立するために、胸腺欠損雄ヌードマウスに、ヒトPC3前立腺癌細胞（総容量0.05mL中、マウスあたり 1×10^6 個細胞）を用い、右脛骨骨膜に隣接して筋肉内に接種し、 34 ± 16 mmHgの間質液圧（interstitial fluid pressure）を有する腫瘍を作製した。腫瘍を400～500 mm³の平均腫瘍量に増殖させ、その後、細胞傷害性薬剤／PEG化rHuPH20、細胞傷害性薬剤単独またはPEG化rHuPH20単独のいずれかを用いる治療を開始した。腫瘍成長は、Visual Sonics イメージングマイクロ超音波システムを使用してモニタリングした。

30

【0 5 4 7】

1つの群中のマウスには、0日目および7日目に、10 mg/kg タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）および10,000 U/マウス PEG化rHuPH20を静脈内に投与した。これは、まず、シリンジ中に、0.1 mLのタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）、続いて、0.1 mLのPEG化rHuPH20を引き上げること、次いで、0.2 mLの溶液をマウスの尾静脈中に直ちに注射することによって実施した。これらのマウスにはまた、0.2 mL中、10,000 U/マウスのPEG化rHuPH20のさらなる用量を、3日目および10日目に静脈内に投与した。対照群のマウス（G2）には、10 mg/kgのドセタキセルQ7D x 2を0日目および7日目に静脈内に投与した。別の対照群のマウスには、30 mg/kgのドセタキセルQ7D x 2を、0日目および7日目に静脈内に投与した。さらなる対照群のマウスには、10,000 U/マウスのPEG化rHuPH20を0、3、7および10日目に静脈内に投与した。APIバッファ

40

50

ーのみを投与された最後の対照群も、研究（G 1）に含めた。種々の時点で腫瘍量を測定し（図 1 および表 2 1）、 1500 mm^3 腫瘍量までの生存パーセンテージも観察した（図 2）。表 2 2 は、生存に対するタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）および PEG 化 rHuPH20 の同時投与の効果の分析を示す。生存期間中央値（MST）（日での）を、各群中の個々の動物に基づいて 1500 mm^3 腫瘍量までの平均期間によって算出した。T/C% は、 $T/C\% = (T/C) \times 100$ （式中、T は、治療群における 1500 mm^3 腫瘍量までの生存期間中央値であり、C は、API バッファー対照群における 1500 mm^3 腫瘍量までの生存期間中央値である）によって算出される。米国国立癌研究所（NCI）判定基準によれば、 125% を超える T/C% を有する処方が活性であると考えられる。寿命の増大（ILS）は、 $[(T-C)/C] \times 100$ として算出される抗腫瘍活性の尺度である〔式中、(T-C) は、治療 (T) および対照 (C) 群間の、 1500 mm^3 腫瘍量までの平均日数における相違である〕。NCI 判定基準によれば、 25% を超える ILS% を有する処方が有効と考えられる。

【0548】

タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）および PEG 化 rHuPH20 の同時投与は、Q7Dx2 によって投与される 10 mg/kg のドセタキセル単独または PEG 化 rHuPH20 単独のものよりも大幅に優れていた、73 日間にわたる相乗的な腫瘍成長阻害、および生存時間の増大（ 1500 mm^3 の腫瘍量に達する時間として定義される）をもたらした。

表 2 1. 腫瘍量に対するタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）および PEG 化 rHuPH20 の同時投与の効果

【0549】

【表 2 2】

治療		治療後種々の日数での腫瘍量(mm3)									
		-1	4	13	21	27	35	42	50	61	73
API バッファ ー(標準 偏差)	A v	472. 06	794. 35	1077 .2	1920 .6	2549 .4					
	S E	126. 29	176. 47	240. 71	711. 18	1095 .7					
タキソテール(登録商 標)(ドセタ キセル)(30 mg/kg)単 独	A v	471. 34	497. 04	401. 12	409. 02	291. 65	213. 73	147. 05	130. 2	343. 03	865. 5
	S E	50.3 3	21.7 6	82.8 5	64.1 6	51.1 7	47.6 1	36.1 8	29.1 6	80.6 5	153. 25
タキソテール(登録商 標)(ドセタ キセル)(10 mg/kg)単 独	A v	470. 39	687. 27	869. 25	1011 .1	1260 .7	1441 .1	1552 .1			
	S E	49.9 6	67.5	106. 58	135. 28	278. 12	405. 71	425. 94			
PEG化rHu PH20単独	A v	469. 47	506. 38	602. 98	1213 .6	2024 .7					
	S E	115. 61	202	202. 24	337. 08	536. 05					
タキソテール(登録商 標)(ドセタ キセル)お よびPEG化 rHuPH20	A v	497	419. 94	392. 34	431. 73	367. 97	348. 28	576. 69	720. 43	1106 .2	1424 .1
	S E	65.5 2	74.9 9	119. 47	120. 87	82.7 4	70.4	179. 41	184. 55	289. 82	407. 88

10

20

30

表 2 2. 生存に対するタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）および P E G 化 r H u P H 2 0 の同時投与の効果

【 0 5 5 0 】

【表 2 3】

治療	マウスの数	平均生存時間	MST	%T/C	%ILS	P値*
対照(APIバッファー)	6	23.01 ± 4.52	20.7	-	-	-
タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)単独	6	38.96 ± 7.07	32.9	157	59	NS対API対照
PEG化rHuPH20単独	5	27.22 ± 3.87	24.7	119	19	NS対API対照
タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)およびPEG化rHuPH20	7	64.71 ± 3.20	67.2	319	225	P=0.0002 API対照;p=0.03対タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)単独

10

20

【0 5 5 1】

PEG化rHuPH20およびリポソームドキソルビシンの同時投与の抗腫瘍効果を評価するために、PC3腫瘍を有するマウスに、6mg/kgドキシル(登録商標)リポソームドキソルビシンおよび10,000U/マウスのPEG化rHuPH20を0、7および14日目に静脈内投与した。これは、まず、シリンジ中に、0.1mLのドキシル(登録商標)リポソームドキソルビシン、続いて、0.1mLのPEG化rHuPH20を引き上げること、次いで、0.2mLの溶液をマウスの尾静脈中に直ちに注射することによって実施した。これらのマウスにはまた、0.2mL中、10,000U/マウスのPEG化rHuPH20のさらなる用量を、3、5、10、12日目に投与した。対照群のマウスには、6mg/kgのドキシル(登録商標)リポソームドキソルビシンを、0、7および14日目に静脈内に投与した。別の対照群のマウスには、0.2mL中、10,000U/マウスのPEG化rHuPH20の用量を、0、3、5、7、10、12および14日目に投与した。APIバッファーのみを投与された最後の対照群も、この研究に含めた。腫瘍量を種々の時点で観察した(図3および表23)。同時投与されたPEG化rHuPH20およびリポソームドキソルビシンの抗腫瘍効果は、リポソームドキソルビシン単独のものよりも統計上有意に優れていることが観察された。

30

表23. 腫瘍量に対するドキシル(登録商標)リポソームドキソルビシンおよびPEG化rHuPH20の同時投与の効果

【0 5 5 2】

【表 2 4】

治療		治療後種々の日数での腫瘍量(mm3)						
		-1	6	13	18	24	27	36
対照(API バッファ ー)	Av.	532.9 5	926.1 2	1908. 97	2322			
	SE	55.69	170.2 5	453.4	469.96			
PEG化rH uPH20単 独	Av.	467.5 2	483.4 2	850.4 6	1096.0 5	1495. 48	1996. 86	
	SE	60.26	104.1 8	290.3 5	358.28	457.4 9	626.1	
ドキシル(登録商標) リポソー ムドキシ ルビシン(10mg/kg) 単独	Av.	454.8 9	880.0 1	1237. 57	1236.6 16	1256. 25	1327. 96	
	SE	65.21	229.4 4	317.6 9	260.81	400.6 8	415.9 7	
ドキシル(登録商標) リポソー ムドキシ ルビシン およびPE G化rHuP H2010年1 2月2日	Av.	452.9 5	352.2 8	451.9 7	497.52	561.2 8	770.2 7	1227. 18
	SE	56.58	55.78	53.37	80.12	73.6	55.91	114.9 8

10

20

30

【0 5 5 3】

B. PC-3M-luc-C6骨転移モデル

PC-3M-luc-C6骨転移モデルを、Jenkins et al. (Clin Exp Metast (2003) 20:745-756) によって記載されるようにヌードマウスで確立した。マウスの生存をモニタリングすることに加え、PC-3M-luc-C6細胞の生物発光によって、マウスを画像にして、PC-3M-luc-C6転移を可視化した。手短には、0日目に、7~10週齢nu/nu雄マウス(Charles River Laboratories)を麻酔し、50μLの滅菌DPBSに懸濁した 3×10^6 個のPC-3M-luc-C6細胞(生物発光ヒト前立腺癌腫細胞株)を用い、心臓内注射によって注射した。マウスに、非外科的手段によって心臓の左心室に注射して、PC-3M-luc-C6細胞からの転移の可能性を増大した。腫瘍細胞の心臓内注射は、肺をバイパスし、細胞を全身循環に分散して、動物内の複数の組織における転移の播種を可能にする方法として働く。左心室への十分な注射は、生物発光イメージング(BLI)によって数分内に検出可能であり、マウスの完全ブルーシグナルBLIによって示されるような、直ちにではあるが一時的な、動物全体にわたる全身の生物発光によって同定された。不首尾の移植は、通常、動物の胸部領域内のみに隔離され、経時的に持続されるより局在したシグナルをもたらした。0および11日目に胸部において高生物発光シグナルを示した動物を研究から除外した。0日目にPC-3M-luc-C6細胞の成功した心臓内注射を施したマウス(n=10~13匹のマウス/Grp)を、最大4週間の間1週間に2回画像にし、続いて、49日目まで、およびその時点を越えて生存につい

40

50

て追跡調査した。すべてのマウスにおいて、種々の組織への転移の初期兆候は、細胞の注射後14日以内に観察された。観察された転移のパターンは、マウスの胸部、顎および／または肢において発生する病変を示した。

【0554】

14日目に、マウスをいくつかの治療計画のうちの1つに付した。対照マウスのセットには、14、16、18、21、23、25、28、30および32日目にAPIバッファー（10mM HEPESおよび130mM NaCl、pH7.0）のみを投与した。2つのその他のセットのマウスには、14および21日目に30mg/kgタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）Q7Dx2、または14、21および28日目に10mg/kgタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）Q7Dx3をそれぞれ投与した。別の群のマウスには、14、16、18、21、23、25、28、30、32および35日目に10,000U/マウスのPEG化rHuPH20を静脈内に投与した。2つのその他の群のマウスには、混合されたPEG化rHuPH20/タキソテル（登録商標）（ドセタキセル）または逐次投与されるPEG化rHuPH20、次いでタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）を投与した。これらの群の最初のものには、注射後14、21および28日目に10mg/kgのタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）および10,000U/マウスのPEG化rHuPH20を静脈内に投与した。これは、まず、シリンジ中に、0.1mLのタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）を、続いて、0.1mLのPEG化rHuPH20を引き上げること、次いで、0.2mLの溶液をマウスの尾静脈中に直ちに注射することによって実施した。これらのマウスにはまた、0.2mL中、10,000U/マウスのPEG化rHuPH20のさらなる用量を、16、18、23、25、30および32日目に静脈内に投与した。同じ投薬を受けたこれらの群の2つ目には、10mg/kgタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）/10,000UのPEG化rHuPH20の混合物の代わりに、10mg/kgタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）用量の投与の2時間前に10,000ユニットのPEG化rHuPH20用量を投与した。

10

20

【0555】

マウスを、0、11、15、18、22、25および29日目に、IVIS（登録商標）イメージングシステム（Xenogen）を使用して先に記載されたように（Jenkins et al. (2003) Clin Exp Metast 20:745-756）画像にし、Living Image（登録商標）ソフトウェア（Xenogen）を使用して分析して、生物発光PC-3M-luc-C6転移を可視化した。0および11日目の初期シグナルは、29日目までのその後の画像によって確認され、ほぼすべての転移性部位が、生物発光の漸増を経時的に示した。マウスの顎領域からのin vivo生物発光シグナルは、歯髄、下顎骨または頸部リンパ節における微小転移に相当する。下肢in vivoシグナルは、脛骨または大腿下肢骨中に同定される転移病巣に相当していた。in vivoで観察される胸部シグナルは、心臓、肺または胸腔の胸腔表面に接種された残存腫瘍細胞と関連している。0日目に成功した全身注射を示し、29日目までに転移のin vivo証拠を示す像を有するマウスを、治療群の分析に含めた。

30

40

【0556】

14および21日目に30mg/kgで静脈内に投与されたタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）は、MTD（最大耐容量）で最高用量レベルに相当する。11日目から29日目にとられた像は、薬物は、治療されたマウスにおいてすべての転移部位で相当な阻害効果を有することを示す。11日目の像は、29日目に生存して残っている11匹のマウスのうち10匹で29日目に検出可能な生物発光強度の低下によって示されるように時間とともに徐々に消失する、代表的な転移パターンを有するマウスを示す。10mg/kgタキソテル（登録商標）（ドセタキセル）治療マウスの像において、発光減少の、より少ない程度であるが同様の傾向が観察され、腫瘍細胞注射の29日後に12匹のうち9匹の生存動物を含んでいた。対照的に、対照PEG化rHuPH20治療動物は、6匹の生存マウスの像からわかるような29日目のリバウンドシグナルによって示される、動物

50

全体の生物発光においてその後の再発の証拠を示した。混合PEG化rHuPH20／タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）を投与されたマウスおよび逐次投与されるPEG化rHuPH20およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）を投与されたマウスの29日目の像は、変化なしから減少したレベルのBLIシグナルの量および強度を示し、このことは、骨部位への腫瘍播種の安定化を示す。特に、逐次用量のPEG化rHuPH20およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）を投与された4匹のマウスは、29日目に完全にシグナルがなくなったと思われ、このことは、治癒の可能性または長期の生存者効果を示す。

【0557】

PC-3M-luc-C6の心臓内注射の49日後の各群のマウスの生存率が、表24に示されている。10,000ユニットのPEG化rHuPH20および10mg/kgのタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）の同時投与は、10mg/kgタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）単独を用いる治療よりも大きな抗腫瘍活性をもたらしたことが観察された。

表24. PC-3M-luc-C6骨転移モデルにおける生存のPEG化rHuPH20およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）の同時投与の効果

【0558】

【表25】

治療	動物数	49日目に生存している動物数	生存%
APIバッファー	13	3	23.08
タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(30mg/kg)	11	10	90.91
タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	12	9	75.00
PEG化rHuPH20	10	4	40.00
PEG化rHuPH20およびタキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(混合)	13	13	100
PEG化rHuPH20およびタキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(2時間離れて逐次)	11	10	90.91

【実施例15】

【0559】

毒性研究—単独およびドセタキセルと組み合わせたPEG化rHuPH20

単独およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）と組み合わせたPEG化rHuPH20の毒性研究のために、ヌードマウスに、種々の用量のPEG化rHuPH20および10mg/kgタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）を投与した。PEG化rHuPH20単独、タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）単独またはAPIバッファー単独を投与されている対照群も研究に含めた。表25は、マウスの各群の治療計画を示す。毒性研究のために、最大26日間研究の過程にわたって体重および生存中の観察をモニタリングした。外部医薬品開発業務受託機関、BioQuant Inc（San Diego, CA）によって、全血および血清サンプルで、差次的および血清臨床化学を用いて完全血液化学を評価した。

【0560】

表26および27および図4および5は、PEG化rHuPH20単独、PEG化rHuPH20／タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）単独の投与後の体重の変化を示す。表27および図6は、PEG化rHuPH20単独、PEG化rHuPH20／タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）単独を投与されたマウスの血液中の顆粒球の数を示し、表28および図7は、PEG化rHuPH20単独、PEG化rHuPH20／タキソテール（登録商標）（ドセタキセル）およびタキソテール（登録商標）（ドセタキセル）単独を投与されたマウスにおける血清アルブミンレベルを示す。健常なマウスの血液中の顆粒球の数の正常範囲は、 $1.2 \sim 6.8 \times 10^3$ 個細胞/ μL であり、正常血清アルブミン範囲は、 $2.5 \sim 4.8 \text{ g/dL}$ である。ドセタキセルおよびPEG化rHuPH20の同時投与は耐容性良好であり、好中球減少症の大幅な増加はなく（顆粒球の大幅な低減がないことによって示されるように）、 30 mg/kg の最大耐容量（MTD）でドセタキセル治療単独と比較して耐容性が良好であることが観察された。最大30,000U／マウスの用量でのPEG化rHuPH20単独の投与も耐容性良好であった。

10

表25．PEG化rHuPH20／タキソテール毒性研究のための治療計画

【0561】

【表 2 6】

群番号	投与経路	投与	投与容積(mL/マウス)	投与頻度
1	IV	APIバッファー(対照群)	0.3	研究日0,3,7,10,14,17,21,24
2	IV	PEG化rHuPH20(3,000U/マウス)	0.3	研究日0,3,7,10,14,17,21,24
3	IV	PEG化rHuPH20(7,000U/マウス)	0.3	研究日0,3,7,10,14,17,21,24
4	IV	PEG化rHuPH20(10,000U/マウス)	0.3	研究日0,3,7,10,14,17,21,24
5	IV	PEG化rHuPH20(30,000U/マウス)	0.3	研究日0,3,7,10,14,17,21,24
6	IV	PEG化rHuPH20(3,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	0.3	研究日0、7、14、21および3、10、17、24日目のPEG単独
7	IV	PEG化rHuPH20(7,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	0.3	研究日0、7、14、21および3、10、17、24日目のPEG単独
8	IV	PEG化rHuPH20(10,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	0.3	研究日0、7、14、21および3、10、17、24日目のPEG単独
9	IV	タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	0.3	研究日0、7、14および3、10、17日目のAPIバッファー単独
10	IV	タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(30mg/kg)	0.3	研究日0、7、14および3、10、17日目のAPIバッファー単独

10

20

30

表 2 6. PEG化rHuPH20単独の投与後の体重の変化

【0562】

【表 2 7】

日 数	体重の変化パーセンテージ									
	APIバツ ファー (対照群)		PEG化rHuPH 20(3,000U/マ ウス)		PEG化rHuPH20 (7,000U/マウス)		PEG化rHuPH20(10,000U/マウス)		PEG化rHuPH20(30,000U/マウス)	
	Av	SE	Av.	SE	Av.	SE	Av.	SE	Av.	SE
3	-4. 3	1.4	-7.8	2.1	-12	2	-12.2	0.7	-13.7	1.3
5	-0. 2	1.7	-8	1	-12.8	2.9	-9.2	0.8	-12.6	1.4
7	-2. 4	1.5	-8.4	1.5	-11.3	3.4	-7.9	1	-11.1	1.8
10	-2. 8	0.8	-9.5	1.2	-9.9	3.2	-7.2	1.1	-10.1	2.4
12	-1	1	-8.5	1	-8.4	2.7	-5.6	2.3	-8.9	2.1
14	2. 4	1.5	-3	1.2	-3.9	2.3	-2.8	4.2	-3.9	2.3
17	-1. 9	1.1	-5	0.7	-4.7	2.4	-1.2	8	-4.7	2.2
19	0	1.7	-0.6	1	-1.3	3	0.5	0.8	-2.8	2.9
21	1. 5	2.2	0.5	1.5	0.7	2.5	2.1	2.5	-0.9	3
24	0. 9	1.9	1.2	2	-0.4	1.5	5.1	2.9	2.6	2.4
26	-0. 2	1.9	-0.4	1.5	2.1	1.2	6.7	5.3	4.5	3.2

10

20

30

表 2 7. P E G 化 r H u P H 2 0 / タ キ ソ テ ー ル (登 録 商 標) (ド セ タ キ セ ル) ま た は
タ キ ソ テ ー ル (登 録 商 標) (ド セ タ キ セ ル) 単 独 の 投 与 後 の 体 重 の 変 化

【 0 5 6 3 】

【表 28】

日数	体重の変化パーセンテージ									
	APIバッファ(対照群)		PEG化rHu PH20(3,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)		PEG化rHu PH20(7,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)		PEG化rHu PH20(10,000U/マウス)+タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)		タキソテール(登録商標)(ドセタキセル)(10mg/kg)	
	Av.	SE	Av.	SE	Av.	SE	Av.	SE	Av.	SE
3	-4.3	1.4	-14.9	3	-13.9	2.6	-11.8	1.2	-4	0.6
5	-0.2	1.7	-15.9	3	-15.3	3.3	-12.9	1.3	-3.1	1.5
7	-2.4	1.5	-16.8	2.8	-13.4	1.3	-12.7	0.6	-5.5	1.8
10	-2.8	0.8	-17.1	2.2	-12.1	2.5	-12.8	1.1	-4.9	2
12	-1	1	-17	2.2	-14.7	3.6	-13	1.3	-5.8	2.2
14	2.4	1.5	-15.2	3.5	-10.3	4	-8.4	0.7		
17	-1.9	1.1	-16.7	3.1	-10.2	3.7	-10.5	1.2		
19	0	1.7	-15.3	2.3	-9	3.6	-8.6	2.2		
21	1.5	2.2								
24	0.9	1.9								
26	-0.2	1.9								

10

20

30

表 28. PEG化rHu PH20 / タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) または
タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 単独の投与後のマウスの血液中の顆粒球の数
【0564】

【表 29】

治療	血液中の顆粒球の数($1 \times 10^3/\mu\text{L}$)			
	マウス1	マウス2	マウス3	平均
APIバッファ ー	2.9	4.1	3.8	3.6
PEG化rHuP H20(3,000U)	3.1	3.1	5.5	3.9
PEG化rHuP H20(7,000U)	5.5	2.7	8.5	5.6
PEG化rHuP H20(10,000 U)	5.7	8.4	10.8	8.3
PEG化rHuP H20(30,000 U)	5.4	3	5.5	4.6
PEG化rHuP H20(3,000U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	3.3	2.4	1.1	2.3
PEG化rHuP H20(7,000U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	1.6	1.5	2.8	1.9
PEG化rHuP H20(10,000 U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	4.1	1.2	2.2	2.5
タキソテー ール(登録商標) (ドセタキセ ル)(10mg/kg)	3.2	0.9	0.7	1.6
タキソテー ール(登録商標) (ドセタキセ ル)(30mg/kg)	1.1	2.4	1.7	1.7

表 29. PEG化rHuPH20 / タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) または
タキソテール (登録商標) (ドセタキセル) 単独の投与後のマウスにおけるアルブミンレ

10

20

30

40

50

ベル

【 0 5 6 5 】

【 表 3 0 】

治療	アルブミンレベル(g/dL)			
	マウス1	マウス2	マウス3	平均
APIバッファ ー	2.4	2.3	2.3	2.3
PEG化rHuP H20(3,000U)	1.9	2	1.9	1.9
PEG化rHuP H20(7,000U)	2	1.7	2	1.9
PEG化rHuP H20(10,000 U)	1.7	1.8	1.7	1.7
PEG化rHuP H20(30,000 U)	1.9	1.9	1.7	1.8
PEG化rHuP H20(3,000U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	0.5	1.8	1.9	1.4
PEG化rHuP H20(7,000U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	1.6	1.8	1.8	1.7
PEG化rHuP H20(10,000 U) + タキソテ ール(登録商 標)(ドセタキ セル)	1.7	2.2	1.7	1.9
タキソテー ール(登録商標) (ドセタキセ ル)(10mg/kg)	2.1	2		2.0
タキソテー ール(登録商標) (ドセタキセ ル)(30mg/kg)	1.3	1.1	0.5	1

10

20

30

40

50

【実施例 16】

【0566】

PC3 異種移植片モデルにおける PEG 化 rHuPH20 単独の抗腫瘍活性

PEG 化 rHuPH20 単独の抗腫瘍活性を調べるために、上記の実施例に記載される PC3 異種移植片モデルを使用して、反復された、持続した投与後の腫瘍成長を測定した。

【0567】

A. PEG 化 rHuPH20 の反復された静脈内投与は、PC3 ヒト前立腺癌モデルにおいて抗腫瘍効果をもたらす。

PC3 ヒト前立腺癌モデルを上記のように作製した。胸腺欠損雄ヌードマウスに、ヒト PC3 前立腺癌細胞（総容量 0.05 mL 中、マウスあたり 1×10^6 個細胞）を用い、右脛骨骨膜に隣接して筋肉内に（IM）接種し、高間質液圧を有する腫瘍を作製した。腫瘍を $400 \sim 500 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍量に増殖させ、その後、対照ビヒクルおよびさまざまな酵素ユニット（U）量の PEGPH20 を用いて以下のとおりに静脈内治療を開始した。5 群のマウスを使用した。群 1（11 匹の動物）に対照ビヒクルを投与し；群 2 中の各動物（8 匹の動物）に 1000 U の PEG 化 rHuPH20 を投与し；群 3 中の各動物（8 匹の動物）に 3,000 U の PEG 化 rHuPH20 を投与し；群 4 中の各動物（8 匹の動物）に 10,000 U の PEG 化 rHuPH20 を投与し；群 5 中の各動物（11 匹の動物）に 30,000 U の PEG 化 rHuPH20 を投与した。各動物に PEG 化 rHuPH20 または対照ビヒクルを、週 3 回（Q3W）、1 日おき（EOD）、月曜、水曜および金曜に、0 日目、次いで、3、5、7、10、12、14 および 17 日目の合計 8 用量投与した。

【0568】

Visual Sonics 超音波システムを使用し、超音波画像診断ソフトウェアプログラムを使用して像を得ることによって、2、4、7、11、14 および 18 日目に各群の動物において、研究の過程にわたって、腫瘍量（ mm^3 ）を測定した。データは、以下の図 8 に、および表 30 に示されている。図 8 中のエラーバーは、表 30 にも列挙されている標準誤差を表す。結果は、反復された静脈内 PEG 化 rHuPH20 の各用量は、各治療後時点で、対照群と比較して、より小さい腫瘍量によって証明されるように、腫瘍成長の低減を引き起こすことを示す。

表 30. PEG 化 rHuPH20 の反復された全身投与は、PC3 腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を低減する

【0569】

10

20

30

【表 3 1】

マウスあたりのPEG化rHuPH20量(各治療)		治療の開始と比較した、種々の日数での腫瘍量(mm ³)					
		-2	4	7	11	14	18
0 (対照)	平均	406.97	795.93	1017.15	1291.00	1733.69	1942.10
	標準誤差	15.86	52.61	70.82	75.72	88.88	181.76
1,000 U	平均	418.48	456.01	586.78	929.09	1291.94	1465.20
	標準誤差	18.14	41.75	69.07	113.70	128.89	205.63
3,000 U	平均	422.24	496.53	567.40	905.50	1281.85	1409.97
	標準誤差	17.13	27.68	32.58	53.39	132.05	192.96
10,000 U	平均	423.19	429.38	607.00	865.88	1180.50	1405.52
	標準誤差	16.79	14.10	34.13	57.35	84.83	89.91
30,000 U	平均	416.25	470.78	589.66	815.17	1039.30	1303.49
	標準誤差	13.42	27.90	39.04	73.87	119.10	127.75

【0570】

治療された動物の腫瘍中のHAの除去を実証するために、各群の動物から得た腫瘍も、上記の実施例8B. 2に記載されるように単離し、固定し、切片にした。その実施例に記載のとおり、5 μmの切片を染色した。免疫組織化学のために、ビオチン標識ヒアルロナン結合タンパク質(HABP-bio)(Seikagaku, Japan)を使用して5 μmの腫瘍切片を染色した。洗浄して一次試薬を除去した後FITC標識ストレプトアビジン(Vector Labs, Canada)を二次試薬として使用した。核を、DAPI(4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)試薬を使用して対比染色した。Insight FireWireデジタルカメラ(Diagnostic Instruments, Michigan)と連動したNikon Eclipse TE2000U顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。結果は、治療された動物各々の腫瘍中に眼に見える染色がないことを示し、これは、1, 000、3, 000、10, 000および30, 000 UのPEG化rHuPH20の全身投与は、このヒト前立腺癌動物モデル中の遠位腫瘍においてすべての検出可能なヒアルロナンを除去したということを実証する。

【0571】

B. PEG化rHuPH20に対する持続した、全身曝露は、腫瘍量を低減する

10匹のPC-3脛骨周囲腫瘍を有するマウスを、上記のように、ヒトPC3前立腺癌細胞(マウスあたり 1×10^6 個細胞、総容量0.05 mL)を用い、右脛骨骨膜に隣接して胸腺欠損ヌードマウスに筋肉内に(IM)接種することによる脛骨周囲移植によって作製した。約300 mm³腫瘍量を有するPC-3脛骨周囲腫瘍を有するマウスに、対照バッファー(APIバッファー)(5動物-対照群)または0.2 mlの容量あたり約20,000酵素ユニット(U)(12日にわたって各マウスに投与される0.7 mg/マウス(35 mg/Kg))のPEG化rHuPH20(5動物)を含有するAlza pumps(Alzet(登録商標)ミニ浸透圧ポンプ、モデル番号2002、Durect Corporation, Cupertino, CA)を用いて皮下に(SC)移植し

た。各群について、ポンプは、14日にわたって、時間あたり0.5マイクロリットルをデリバリーし、これは、PEG化rHuPH20を用いて治療される群にとっては、時間あたり50U；1日あたり1,200Uに匹敵した。

【0572】

腫瘍量 (mm^3) を、Visual Sonic 超音波システムを使用し、超音波画像診断ソフトウェアプログラムを使用して像を得ることによって、治療前、-1日目に、および研究の終了時の12日目に測定した。結果は、以下の表31に示されている。表に示されるように、対照群中の1匹のマウスが、研究の結論の前に死亡していることがわかった。

表31. PEG化rHuPH20の連続投与は、PC3腫瘍量を低減する

【0573】

【表32】

治療群		腫瘍量(mm^3)	
		-1日目	12日目
対照(APIバッファー)	マウス1	160.82	死亡と見られた
	マウス2	245.18	777.22
	マウス2	254.59	983.69
	マウス4	355.1	743.72
	マウス5	442.09	964.37
	平均($\pm$ SE)	291.56 $\pm$ 48.55	867.25 $\pm$ 62.15
マウスあたり20,000U(合計)のPEG化rHuPH20	マウス1	178.91	324.27
	マウス2	212.19	439.67
	マウス2	262.65	264
	マウス4	286.13	426.5
	マウス5	560.42	245.08
	平均 $\pm$ SE	300.06 $\pm$ 67.62	339.904 $\pm$ 45.03

【0574】

表31に示されるように、PEG化rHuPH20の持続した静脈内曝露（合計20,000U、12日間にわたって）は、対照動物と比較して腫瘍成長を低減した。対照群およびPEG化rHuPH20で治療された群における腫瘍量間で、12日目に有意差 ($p < 0.0015$) が観察された。したがって、PEG化rHuPH20の連続投与は、ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおいて抗腫瘍効果を有する。

【0575】

マウスの体重も、-1、0、4、6、8および11日目に測定した。これらの結果は、以下の表32に示されている。

表32：対照バッファーまたはPEG化rHuPH20の連続投与後の体重

【0576】

【表 3 3】

治療群		0日目		4日目		6日目		8日目		11日目	
		BW (g)	% Ch	BW (g)	% Ch	BW (g)	% Ch	BW (g)	% Ch	BW (g)	% Ch
対照(APIバツファー)	マウス1	23.75	0.00	20.54	-13.52	20.46	-13.85	20.31	-14.48	fd	N/A
	マウス2	22.8	0.00	23.33	2.32	23.67	3.82	23.24	1.93	23.64	3.68
	マウス2	23.27	0.00	22.15	-4.81	22.02	-5.37	22.45	-3.52	23	-1.16
	マウス4	21.82	0.00	21.82	0.00	21.57	-1.15	21.96	0.64	22.41	2.70
	マウス5	25.32	0.00	23.26	-8.14	23.12	-8.69	23.55	-6.99	24.29	-4.07
	Avg	23.39	0	22.22	-4.83	22.17	-5.05	22.30	-4.49	23.33	0.29
マウスあたり20,000 U (合計)のPEG化rHuPH20	マウス1	25.76	0.00	23.92	-7.14	24.06	-6.60	24.79	-3.77	26.08	1.24
	マウス2	24.24	0.00	23.01	-5.07	23.41	-3.42	23.38	-3.55	23.32	-3.80
	マウス2	24.70	0.00	23.1	-6.48	23.36	-5.43	23.42	-5.18	23.93	-3.12
	マウス4	22.97	0.00	22.6	-1.61	23.36	1.70	22.64	-1.44	23.01	0.17
	マウス5	21.26	0.00	19.71	-7.29	20.02	-5.83	20.93	-1.55	21.31	0.24
	Avg	23.79	0.00	22.47	-5.52	22.84	-3.92	23.03	-3.10	23.53	-1.05

* Avg = 平均 ; BW (g) = グラムでの体重 ; % Ch = 0日目からの変化パーセント ; fd = 死亡と見られた

【実施例 17】

【0577】

複数のHA発現性腫瘍におけるPEG化rHuPH20のIn vivo HA低減活性および抗腫瘍活性

A. PEG化rHuPH20の全身投与は、複数のHA発現性腫瘍においてHAを除去する

ビヒクルまたはPEG化rHuPH20 (10,000 U/マウス = 15 mg/Kg) の静脈内投与の2時間後、ヒアルロナン (HA) の発現を、腫瘍の動物モデル中の種々の腫瘍 (以下の表33に列挙される) において、上記の実施例8B. 2に記載のとおり評価した。モデルは、種々の癌性細胞株から以下に記載されるとおりに作製した。

【0578】

(i) 細胞株

動物腫瘍モデルを作製するために使用された癌性細胞株は、以下の表33に列挙されている。ヒトホルモン不応性前立腺癌細胞株 (PC3、DU145) ; ヒト膵臓癌細胞株 (MIPACA II、BXP3) ; ヒト乳癌細胞株 (MDA MB 231) ; ヒト結腸癌細胞株 (HCT116、HT29) およびヒト非小細胞肺癌細胞株 (NCI H4

10

20

30

40

50

60) は、ATCC (Manassas, VA) から購入した。Dunning ラット前立腺癌細胞株 (Mat Ly Lu) は、McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, H3A 1A1 Canada の医薬、生理学および腫瘍学科から親切に寄付された。マウス胸部細胞株 (4T1-GFP) は、Sidney Kimmel 癌センター (SKCC, San Diego, CA) から寄付された。ヒト膵臓癌細胞株、Capan-1 H2B は、Sidney Kimmel 癌センター (SKCC, San Diego, CA) から寄付された。

【0579】

PC3 細胞は、2 mM L-グルタミンを含み、1.5 g/L の炭酸水素ナトリウムを含むよう調整され 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Ham's F12K 培地 (Mediatech Inc.) で維持した。MIA-PACA-II 細胞は、10% FBS (Mediatech Inc.) を含むダルベッコ改変イーグル培地で維持した。Mat Ly Lu 細胞は、10% FBS、2 mM L-グルタミンおよび 250 nM デキサメタゾンを含む RPMI 1640 で維持した。その他の細胞は、10% FBS を含む RPMI 1640 培地で維持した。PC3 ヒト前立腺癌動物モデルは、上記の実施例 8 に記載のとおり作製した。約 400~800 mm³ に達した腫瘍量を有する動物を選択し、次いで、ビヒクルまたは PEG 化 rHuPH20 (10,000 U/マウス = 15 mg/Kg) の静脈内注射によって治療した。

【0580】

(ii) 動物腫瘍モデル

PC3 および Du145 ヒト前立腺異種移植片モデル

PC3 および Du145 異種移植片腫瘍モデルを、それぞれ、PC3 および Du145 細胞を使用して以下のとおり作製した。腫瘍細胞を、約 80% コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS (Hank's 平衡塩溶液、Mediatech Inc.) で 1 回洗浄し、氷上で、HBSS 中、50% Matrigel (登録商標) に、 2×10^7 個細胞/mL で再懸濁し、その後、動物に接種した。胸腺欠損雄ヌードマウスに、この細胞懸濁液 0.05 mL を用い、左下肢中、脛骨周囲に (脛骨骨膜に隣接して) 筋肉内に (IM) 接種した。動物中の腫瘍の容積が、400~500 mm³ に達したと思われる時点で、Visual Sonics 超音波を使用し、2 つの直交軸寸法を使用して実際の腫瘍量を決定した。

【0581】

動物を、各々 3~4 匹の動物の 2 つの群に無作為にグループ化し、それぞれ、ビヒクル (API バッファー) および PEG 化 rHuPH20 (10,000 U/マウス = 約 15 mg/Kg) の静脈内注射によって治療した。治療の 2 時間後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的評価のために 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (NBF) 中で固定した。

【0582】

MIA-PACA-II、BXPC3 (ヒト膵臓癌モデル)、HCT116、HT29 (ヒト結腸癌モデル) および NCI H460 (ヒト非小肺癌モデル)

MIA-PACA-II、BXPC3、HCT116、HT29 および NCI H460 異種移植片腫瘍モデルを、それぞれ、MIA-PACA-II、BXPC3、HCT116、HT29 および NCI H460 細胞を使用して以下のとおり作製した。腫瘍細胞を、約 80% コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS (Hank's 平衡塩溶液、Mediatech Inc.) で 1 回洗浄し、氷上で、HBSS に 2×10^7 個細胞/mL で再懸濁し、その後、動物に接種した。胸腺欠損雌ヌードマウスに、この細胞懸濁液 0.05 mL を用い、左下肢中、脛骨周囲に (脛骨骨膜に隣接して) 筋肉内に (IM) 接種した。動物中の腫瘍の容積が、400~500 mm³ に達したと思われる時点で、Visual Sonics 超音波を使用して実際の腫瘍量を決定した。動物を、各々 3~4 匹の動物の 2 つの群に無作為にグループ化し、それぞれ、ビヒクル (API バッファー) および PEG 化 rHuPH20 (10,000 U/マウス = 約 15 mg/Kg) の静脈内注射によって治療した。治療の 2 時間後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的

10

20

30

40

50

評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液(NBF)中で固定した。

【0583】

MDA MB231ヒト乳癌異種移植片モデル

MDA MB231ヒト乳房腫瘍異種移植片モデルを、MDA MB231細胞株を使用して以下のとおりに作製した。腫瘍細胞を、約80%コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS(Hank's平衡塩溶液、Mediatech Inc.)で1回洗浄し、氷上で、HBSS中、50% Matrigel(登録商標)に、 4×10^7 個細胞/mLで再懸濁し、その後、接種した。胸腺欠損雌ヌードマウスに、細胞-Matrigel(登録商標)懸濁液0.05mLを用い、乳房脂肪体中に同所的に接種した。不十分な腫瘍獲得のために、腫瘍組織移植を実施して、研究のためにより多くの腫瘍を有する動物を作製した。500mm³を超える腫瘍量を有する動物を選択し、これらの動物から腫瘍を摘出し、滅菌培地ですすぎ、ブレードで1mm角に刻んだ。次いで、これらの腫瘍組織を外套針を使用して雌のヌードマウスの乳房脂肪体中に移植した。固形腫瘍塊の長さ(L)および幅(W)を、ノギスで週に2回測定し、腫瘍量(TV)を、 $(L \times W^2) / 2$ として算出した。それらの腫瘍の容積が約1000mm³に達した時点で、各々5匹のマウスの2つの群に動物を無作為に分け、2群の動物を、それぞれ、ビヒクルまたはPEG化rHuPH20(3000U/マウス=約4.5mg/Kg)の静脈内注射によって治療した。治療の3日後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液(NBF)中で固定した。

10

【0584】

Capan-1ヒト膵臓腫瘍異種移植片モデル

Capan-1ヒト膵臓異種移植片腫瘍モデルを、Capan-1 HB2細胞株を使用して以下のとおりに作製した。腫瘍細胞を、約80%コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS(Hank's平衡塩溶液、Mediatech Inc.)で1回洗浄し、氷上で、HBSS溶液に 5×10^7 個細胞/mLで再懸濁し、その後、接種した。胸腺欠損雌ヌードマウスに、細胞懸濁液0.1mLを用い、皮下に接種した。固形腫瘍塊の長さ(L)および幅(W)を、ノギスで週に2回測定し、腫瘍量(TV)を、 $(L \times W^2) / 2$ として算出した。それらの腫瘍の容積が、およそ約500~700mm³に達した時点で、動物を、各々3~4匹のマウスの2つの群に無作為に分けた。これらの群の動物を、それぞれ、ビヒクル(APIバッファー)およびPEG化rHuPH20(5000U/マウス=約7.5mg/Kg)の静脈内注射によって治療した。治療の3日後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液(NBF)中で固定した。

30

【0585】

4T1-GFP乳癌腫瘍モデル

4T1-GFP乳癌モデルを、4T1-GFP細胞株を使用して以下のとおりに作製した。4T1-GFP腫瘍細胞を、約80%コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS(Hank's平衡塩溶液、Mediatech Inc.)で1回洗浄し、氷上で、HBSSに、 2×10^6 個細胞/mLで再懸濁し、その後、接種した。雌Balb/cマウスに、細胞懸濁液0.05mLを用い、乳房脂肪体中に同所的に接種した。固形腫瘍塊の長さ(L)および幅(W)を、ノギスで週に2回測定し、腫瘍量(TV)を、 $(L \times W^2) / 2$ として算出した。それらの腫瘍の容積が約500~700mm³に達した時点で、動物を、各々3~4匹のマウスの2つの群に無作為に分け、これらの群をそれぞれ、ビヒクルおよびPEG化rHuPH20(10,000U/マウス=約15mg/Kg)の静脈内注射によって治療した。治療の2時間後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液(NBF)中で固定した。

40

【0586】

Mat LyLuラット前立腺腫瘍モデル

Mat LyLu腫瘍モデルを、Mat LyLu細胞株を使用して以下のとおりに作製した。腫瘍細胞を、約80%コンフルエンスでトリプシン処理し、回収し、HBSS

50

(Hank's 平衡塩溶液、Mediatech Inc.) で1回洗浄し、氷上で、HBSSに、 1×10^6 個細胞/mLで再懸濁し、その後、接種した。胸腺欠損雄ヌードマウスに、ラットMat Ly Lu 前立腺癌細胞 (総容量0.04 mL中、マウスあたり 2×10^5 個細胞) を用い、右脛骨骨膜に隣接して筋肉内に接種した。腫瘍量が400~500 mm³ に達したと思われる時点で、Visual Sonics 超音波を使用して実際の容積を決定した。動物を、各々3~4匹の2群に無作為に入れ、これを、それぞれ、ビヒクルおよびPEG化 rHuPH20 の静脈内注射によって治療した。治療の2時間後に腫瘍組織を回収し、さらなる組織学的評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液 (NBF) 中で固定した。

【0587】

10

(iii) 免疫組織化学

各動物モデル (実施例17A (ii)、上記) から得た固定された腫瘍を、5 μmの切片に切断した。回収された腫瘍中のヒアルロナン (HA) の量を評価するために、ビオチン標識ヒアルロナン結合タンパク質 (HABP-bio) (Seikagaku, Japan) を使用して切片を染色した。洗浄して一次試薬を除去した後、FITC標識ストレプトアビジン (Vector Labs, Canada) またはテキサスレッド標識ストレプトアビジン (4T1-GFP腫瘍切片のための; Vector Labs, Canada) を、二次試薬として使用した。核を、DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) 試薬を使用して対比染色した。Insight FireWire デジタルカメラ (Diagnostic Instruments, Michigan) と連動した Nikon Eclipse TE2000U 顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。

20

【0588】

切片中のHA発現を、+++ (視野の80%超における強い染色) から+/- (薄い染色)、- (眼に見える染色なし) の範囲の採点システムを使用し、切片中 (腫瘍領域および関連間質領域) の蛍光強度のレベルによって段階付けした。結果は、以下の表33に示されている。表は、マウス異種移植片モデルを作製するために使用された各細胞株の名称、腫瘍の種類および細胞株が単離された種を示す。ビヒクルおよびPEG化 rHuPH20 を用いる治療後の各腫瘍種モデルのHA発現の程度が示されている。結果は、すべてのHA発現性腫瘍において、HA発現が、PEG化 rHuPH20 を用いる治療によって低下することを示す。表に示されるように、HT29腫瘍切片およびCapan-1腫瘍切片 (ビヒクルを用いて注射された動物から得た) は、PEG化の前に、細胞周囲領域において陰性染色および間質において陽性染色を示した。

30

表33: PEG化 rHuPH20 を用いる全身投与後のHA発現性腫瘍におけるヒアルロナン (HA) 発現低減

【0589】

【表 3 4】

腫瘍細胞株 名称	腫瘍種	腫瘍供給源種	腫瘍組織におけるHA発現	
			ビヒクル	PEG化rHuPH20
PC-3	前立腺	ヒト	+++	-
4T1	乳房	マウス	++	-
MIA PACA II	膵臓	ヒト	++	-
BxPC3	膵臓	ヒト	+ / ++	-
MatLyLu	前立腺	ラット	+	-
MDA MB 231	乳房	ヒト	+	-
HCT 116	結腸	ヒト	+ / -	-
HT29*	結腸	ヒト	+ / -	-
NCI H460	NSCLC	ヒト	+ / -	-
Du145	前立腺	ヒト	+ / -	-
Capan-1*	膵臓	ヒト	-	-

10

20

* 細胞周囲領域における陰性染色；間質における陽性染色

【0590】

B. 例示的なHAが豊富な腫瘍におけるPEG化rHuPH20による腫瘍HAの用量依存性除去

1種の例示的なHAが豊富な（++）腫瘍モデル、4T1-GFP中の動物を、上記のように作製し、ビヒクルおよび種々の量（マウスあたり10、100、1,000、3,000および10,000酵素ユニット（U））のPEG化rHuPH20を用いて治療した。この治療の投与の3日（72時間）後、マウスから得た脛骨周囲腫瘍を回収し、中性緩衝ホルマリン中で固定した。腫瘍中のヒアルロナン（HA）のレベルを、上記の実施例17Aに記載のとおり免疫組織化学（IHC）によって、二次としてアビジン-テキサスレッドを使用して評価した。腫瘍切片でヘマトキシリン／エオシン（H&E）染色も行った。結果は、100、1,000、3,000および10,000UのPEG化rHuPH20を用いて治療された動物から得た腫瘍切片におけるHA染色の用量依存性低減を示した。1,000、3,000および10,000UのPEG化rHuPH20を投与されている動物から得た切片では、眼に見える染色は観察されなかった。これらの結果は、PEG化rHuPH20の単回の全身投与は、乳房遠位腫瘍モデルにおいてヒアルロナンを少なくとも3日間低減させ得るということを示した。

30

【0591】

C. PEG化rHuPH20投与は、腫瘍成長を阻害し、HAが豊富な腫瘍モデルにおいて生存を増大する

40

PEG化rHuPH20単独の反復投与が、複数の腫瘍モデル系において抗腫瘍効果をもたらすことを実証するために、先の実施例において列挙される細胞株を使用して作製した3種の異なるマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍成長および生存を評価した。これらの研究では、2種の異なる前立腺癌モデル（PC3（上記の実施例17Aにおいて決定される、HA+++）およびMatLyLu（上記の実施例17Aにおいて決定される、HA+））および1種の乳癌モデル（4T1-GFP（上記の実施例17Aにおいて決定される、HA++））をPEG化rHuPH20を用いて治療した。

【0592】

これらの研究のために、合計6群のマウス（それぞれ、1つの対照および各腫瘍モデルの実験群（群あたりn=6～8匹の動物）に、PEG化rHuPH20を用い、以下に記

50

載されるように投薬し、腫瘍量および生存について評価した。各群について、治療前に腫瘍成長を測定し、次いで、Visual Sonics イメージングマイクロ超音波システムを使用して治療の過程にわたってモニタリングした。以下に記載されるように、 1500 mm^3 エンドポイント腫瘍量を瀕死状態と同等とみなすことによって、動物生存に対するPEG化rHuPH20治療の効果を評価した。

【0593】

PC3ヒト前立腺癌モデルを、上記のように作製した。胸腺欠損雄ヌードマウスに、ヒトPC3前立腺癌細胞（総容量 0.05 mL 中、マウスあたり 1×10^6 個細胞）を用い、右脛骨骨膜に隣接して筋肉内に播種して、高間質液圧を有する腫瘍を作製した。腫瘍を $400 \sim 500\text{ mm}^3$ の平均腫瘍量に増殖させ、その後、マウスあたり3,000酵素ユニット（U）のPEG化rHuPH20を用い、または対照ビヒクル（API-バッファ）を用い静脈内治療を開始した。群あたり $n=7$ マウス。動物は、Q3dx9スケジュール（3日毎に1回、合計9用量）で、0、3、6、9、12、15、18、21および24日目に3日毎に治療した。

10

【0594】

上記のように、4T1-GFP乳房腫瘍モデルは、BALB/c雌マウスに、4T1-GFP乳癌細胞（総容量 0.05 mL 中、マウスあたり 5×10^5 個細胞）を用い、乳房脂肪体中に同所的に接種することによって作製した。腫瘍を 100 mm^3 の平均腫瘍量に増殖させ、その後、静脈内治療を開始した。治療のために、API-バッファ（対照群）を用い、またはマウスあたり3,000酵素ユニット（U）のPEG化rHuPH20を用い、1日おき（EOD）に、合計6用量の間（Q2dx6投薬計画）、0、2、4、7、9および11日目に、マウスに注射した。群あたり $n=6 \sim 8$ 匹マウス。

20

【0595】

Mat Ly Lu前立腺腫瘍モデルのために、胸腺欠損雄ヌードマウスに、Mat Ly Lu前立腺癌細胞（総容量 0.04 mL 中、マウスあたり 2×10^5 個細胞）を用い、右脛骨骨膜に隣接して筋肉内に接種して、高間質液圧を有する腫瘍を作製した。腫瘍を 100 mm^3 の平均腫瘍量に増殖させ、その後、治療を開始した。治療のために、API-バッファ（対照群）を用い、または3000UのPEG化rHuPH20を用い、動物に静脈内に投薬した。群あたり、 $n=6 \sim 8$ 匹の動物。投薬は、1日おきに、週に3回、月曜、水曜および金曜に（Q2dx6）、0、2、4、7、9および11日目に投与した。しかし、対照群では、Mat Ly Lu腫瘍が、11日目までに危機的容量または $2,000\text{ mm}^3$ 超に達し、従って、人道的理由のために屠殺した。

30

【0596】

PC3腫瘍を有する動物の各群について、Visual Sonics（VS）イメージングマイクロ超音波システムを使用して腫瘍成長をモニタリングした。4T1およびMat Ly Lu腫瘍を有する動物における腫瘍成長は、ノギスを用いて測定した。ノギスを用いる二次元直径測定によって、式 $0.4(a \times b^2)$ （式中「a」は、大きな腫瘍直径であり、「b」は、小さな垂直直径である）を使用して連続腫瘍量を得た。

【0597】

腫瘍量および生存を経時的に評価したこの研究の結果は、以下の節に論じられている。腫瘍量データは、以下の節（i）に記載されており、表33～36に、および図9の一番上のパネルに示されている。生存データは、節（ii）に記載されており、表38に、および図9の一番下のパネルに示されている。

40

【0598】

（i）腫瘍量効果

VS-超音波およびノギス腫瘍量は、 mm^3 で表した。2群のPC3腫瘍を有する動物（対照および3000UのPEG-rHuPH20）について、-1、3、6、10、13、17、20、24、27、31、34、38、41および45日目に測定値をとった。結果は、表34に示されている。 1500 mm^3 を超えて到達している腫瘍を有する動物は、以下に記載されるように人道的理由のために屠殺した。したがって、PC3モデル

50

について、100%の動物がこの腫瘍重量に達したため、27日目以後は測定を行わなかった。4T1-GFPを有する腫瘍の2群については、ノギス測定値は、0、2、4、7、9、11、14、16、18および21日目にとった。結果は表35に示されている。Mat-Ly-Luを有する腫瘍の2群については、0、2、4、7および9日目にノギス測定値をとった。結果は表36に示されている。

表34. 反復された全身PEG化rHuPH20投与は、PC3前立腺腫瘍モデルにおいて長時間かけて腫瘍量を達成する

【0599】

【表35】

治療の開始 と比較した 、日数での腫 瘍量(mm ³)	治療(U/マウスrHuPH20)			
	0 (APIバッファ)		3000	
	平均	SEM	平均	SEM
-1日目	440.31	27.05	439.00	28.01
3日目	494.05	15.99	298.65	29.98
6日目	774.09	40.86	486.72	30.37
10日目	1043.11	98.11	575.10	50.58
17日目	1606.10	168.80	783.10	86.90
20日目	1930.10	242.00	1009.30	134.10
24日目	2450.20	239.20	1065.50	153.80
27日目	2926.20	281.70	1205.50	193.10
31日目	N/A	N/A	1364.90	231.80
34日目	N/A	N/A	1520.80	268.10
38日目	N/A	N/A	1714.40	321.90
41日目	N/A	N/A	1963.80	379.90

* N A = 該当なし—すべての動物が、1500 mm³ 超の腫瘍量のために屠殺された

表35. 反復された全身PEG化rHuPH20投与は、4T1乳房腫瘍モデルにおいて長時間かけて腫瘍量を達成する

【0600】

【表36】

治療の開始 と比較した 、日数での腫 瘍量(mm ³)	治療(U/マウスrHuPH20)			
	0 (APIバッファ)		3000	
	平均	SEM	平均	SEM
0日目	63.27	11.13	67.36	10.75
2日目	159.02	14.45	147.41	10.40
4日目	226.97	22.63	158.66	22.71
7日目	271.64	28.77	184.21	17.47
9日目	438.28	62.57	251.37	28.77
11日目	638.49	113.56	336.46	39.99
14日目	1099.31	254.54	483.68	93.73
16日目	1468.76	260.78	650.66	115.87
18日目	1707.37	225.72	861.36	171.18
21日目	2254.99	375.00	1227.40	352.71
25日目	2693.19	279.51	1536.89	398.65

10

20

30

40

50

表 3 6 . 反復された全身 P E G 化 r H u P H 2 0 投与は、M a t L y L u 前立腺腫瘍モデルにおいて長時間かけて腫瘍量を達成する

【 0 6 0 1 】

【表 3 7】

治療の開始 と比較した 、日数での腫 瘍量(mm ³)	治療(U/マウスrHuPH20)			
	0 (APIバッファ)		3000	
	平均	SEM	平均	SEM
0日目	76.10	10.80	75.70	17.80
2日目	355.70	35.20	208.00	56.90
4日目	853.00	29.80	470.90	61.20
7日目	2248.80	96.50	1518.90	158.10
9日目	3571.00	305.40	2384.40	382.10

10

【 0 6 0 2 】

腫瘍量測定値によって示されるように、P E G 化 r H u P H 2 0 の反復された静脈内投与は、各モデルにおいて腫瘍成長を低減させ、上記の実施例 1 7 A において決定される腫瘍中の H A の量と相関を有する。例えば、各腫瘍モデルにおける P E G 化 r H u P H 2 0 治療された群および対照群間の腫瘍量における有意差（P C 3 前立腺癌モデルにおいて 2 7 日目で $p = 0.001$ ；4 T 1 乳癌モデルにおいて 1 4 日目で $p = 0.04$ ；および M a t L y L u 前立腺癌モデルにおいて 9 日目で $p = 0.02$ ）。

20

【 0 6 0 3 】

それぞれの腫瘍モデル各々の腫瘍成長阻害（T G I）パーセントを、以下の方程式を使用して算出した：

$$TGI\% = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

（式中、「 T_n 」は、P E G 化 r H u P H 2 0 の最終用量後の、「 n 」日目（ここでは、それぞれ P C 3、4 T 1 および M a t L y L u モデルについて、2 7 日目、1 4 日目および 9 日目）の治療群の（P E G 化 r H u P H 2 0 を投与されている動物）の平均腫瘍量である；「 T_0 」は、治療前の 0 日目のその治療群における平均腫瘍量である；「 C_n 」は、「 n 」日目（ここでは、それぞれ P C 3、4 T 1 および M a t L y L u モデルについて、2 7 日目、1 4 日目および 9 日目）の対応する対照群の平均腫瘍量である；ビヒクルの最終用量後しばらく；および「 C_0 」は、治療前の 0 日目の対照群における平均腫瘍量である）。それぞれの腫瘍モデルの腫瘍量までの時間（T T V）は、1, 5 0 0 m m³ の腫瘍量に達する平均時間として算出した。

30

表 3 7 . 腫瘍成長阻害

【 0 6 0 4 】

【表 3 8】

	腫瘍モデル		
	PC3 (n=27日目)	4T1 (n=14日目)	Mat LyLu (n=9日目)
$C_n - C_0$	2485.89 $\pm$ 270.94	1049.74 $\pm$ 262.07	3494.96 $\pm$ 304.94
$T_n - T_0$	766.26 $\pm$ 217.15	412.36 $\pm$ 81.90	2308.63 $\pm$ 397.76
TGI	70 %	60 %	34 %

40

【 0 6 0 5 】

表 3 7 に示されるように、この研究の結果は、それぞれ、P C 3 前立腺、4 T 1 乳房お

50

よびMat LyLu前立腺腫瘍モデルにおいて全身PEG化rHuPH20投与による、70%、60%および34%の腫瘍成長阻害(TGI)を示した(それぞれ、投与後27日目、14日目および9日目)。

【0606】

図9に、および表34～37に示されるように、腫瘍量に対する効果は、上記の実施例17Aにおいて決定された腫瘍HA発現のレベルと相関していた。例えば、PEG化rHuPH20によって、腫瘍中に最高の相対HA発現を有するモデル(PC3(HA+++))において腫瘍量は最も低減され(TGI=70%)、腫瘍中に最低の相対HA発現を有するモデル(Mat LyLu(HA+))において最小(TGI=34%)であった。腫瘍量の低減は、上記の実施例17Aにおいて++の相対HAレベルを示した4T1-GFPモデルにおいて中間(TGI=60%)であった。

10

【0607】

(ii) 生存効果

全身の、反復されたPEG化rHuPH20投与の、生存に対する効果を、各群において各時点で「生存している」動物のパーセンテージを決定することによって各モデルにおいて評価した。この研究のために、1500mm³以上の腫瘍量を、瀕死(生存していない)状態と似ていると考えられるエンドポイントとして選択した。したがって、1500mm³未満の腫瘍量を有する動物を、生存していると考え、一方で、1500mm³以上の腫瘍重量を有する動物は、病的と考えた。

【0608】

種々のモデルでのPEG化rHuPH20の反復投与による生存の効果は、図9(下のパネル)に示されている。図9(下のパネル)に示されるように、PEG化rHuPH20を用いる治療は、それぞれ、PC3、4T1-GFPおよびMat LyLu腫瘍モデルにおいて、対照治療と比較して、指定された瀕死状態への到達において2倍、1.7倍および1.5倍の遅延をもたらした。したがって、生存に対する効果も、上記の実施例17Aにおいて測定される腫瘍中のHAの相対発現と相関していた。

20

【0609】

各群においてマウスが、指定された1500mm³腫瘍量エンドポイントに達する前の平均期間として、各動物群の日数での生存期間中央値(MST)を決定した。ILS(寿命の増大)パーセント、対照と比較したPEG化rHuPH20による抗腫瘍活性の尺度を、以下の方程式を使用して算出した

30

$$ILS\% = [(T - C) / C] \times 100$$

(式中、「T」は、PEG化rHuPH20を用いて治療された群のMSTであり、「C」は、対照群のMSTである)。米国国立癌研究所(NCI)判定基準によれば、25%を超えるILS%を有する治療が有効と考えられる。結果は、以下の表38に要約されている。

表38：生存期間中央値および寿命の増大

【0610】

【表39】

治療	モデル					
	PC3		4T1		Mat LyLu	
	MST	ILS	MST	ILS	MST	ILS
対照	16.13	N/A	16.57	N/A	5.67	N/A
3000 U PEG-P H20	31.83	97 %	28.66	73 %	8.83	56 %

40

NA = 該当なし

【0611】

上記の表38に示されるように、PEG化rHuPH20を用いる全身治療は、それぞ

50

れ、P C 3 前立腺、4 T 1 乳房およびM a t L y L u 前立腺腫瘍モデルにおいて97%、73%および56%の寿命の増大（I L S）を引き起こし、やはり、上記の実施例17Aに記載される、測定された腫瘍中の相対H A レベル（それぞれ、+++、++および+）と相関する。

【0612】

これらの結果は、反復された、P E G 化可溶性ヒアルロニダーゼ単独の全身投与は、いくつかのH A の豊富な腫瘍モデルにおいて抗癌治療として有効であるということ、および抗腫瘍効果の程度は、腫瘍中のH A の発現と相関することを示す。

【0613】

（i i i）腫瘍中のH A の低減

さらに、腫瘍組織ヒアルロナンの免疫組織化学的検出のために最後のP E G 化r H u P H 2 0 または対照治療の後に腫瘍を採取した。この研究のために、P C - 3 腫瘍を、最後の治療の72時間後（20日目）に採取し、4 T 1 - G F P 腫瘍を、最後の治療の72時間後（14日目）に採取し、M a t L y L u 腫瘍を、最後の治療の24時間後（12日目）に採取した。採取した腫瘍は、中性緩衝ホルマリン（N B F）中で固定し、5 μ m の切片を切断し、ビオチン標識ヒアルロン結合性タンパク質（H A B P - b i o）（S e i k a g a k u、J a p a n）を使用して染色した。洗浄して一次試薬を除去した後、P C - 3 およびM a t L y L u 腫瘍についてはF I T C 標識ストレプトアビジン（V e c t o r L a b s、C a n a d a）、またはテキサスレッド標識ストレプトアビジンを二次試薬として使用した。核を、D A P I（4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）試薬を使用して対比染色した。Insight FireWireデジタルカメラ（Diagnostic Instruments、Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U倒立蛍光顕微鏡または同一イメージングシステムを有するZEISSオーバーヘッド顕微鏡（Carl Zeiss, Inc.）によって顕微鏡写真を撮った。結果は、対照腫瘍において強いH A 染色を示したが、P E G 化r H u P H 2 0 を用いて治療された動物から得た腫瘍では検出可能なヒアルロン染色はなく、このことは、治療によって引き起こされる腫瘍ヒアルロナンの持続した低減を示す。

【実施例18】

【0614】

P E G 化r H u P H 2 0 の血液脳関門透過性および脳腫瘍モデルの治療

この研究は、P E G 化r H u P H 2 0 は、動物モデルにおける脳腫瘍においてヒアルロン酸（H A）を低減し得、放射線療法と組み合わせて生存を増大し得ることを実証するために実施した。

【0615】

A. 脳腫瘍モデル

脳腫瘍モデルを作製するために、以下のように、種々の群で各マウスの定位固定フレームを用い、2 μ l のH a n k s 培地中、4 $\times$ 10⁴ 個のP C 3 細胞を右大脳半球に注射した。

【0616】

B. 静脈内に投与されたP E G 化r H u P H 2 0 による脳H A の血液脳関門透過性および分解

この研究は、静脈内に投与されたP E G 化r H u P H 2 0 が、脳腫瘍においてH A を分解し得るということを実証するために実施した。上記の実施例18Aに記載される種々の群の脳腫瘍モデル動物に、3,000酵素ユニット（U）P E G 化r H u P H 2 0 および対照バッファー（A P I）を静脈内に投与した。動物は、4時間後に屠殺した。続いて、脳を採取し、分析のために切片を作製した。

【0617】

腫瘍モデル動物における損なわれた血液脳関門（B B B）の評価のために、動物のサブセットでB B B 透過性アッセイを実施した。このアッセイのために、2%エバンスブルー色素0.1 mLを、これらのマウスの尾静脈中に静脈内注射し、1時間後屠殺した。脳切

片を作製し、以下に記載されるように可視化した。脳切片中の青色色素は、エバンスブルーと複合体化しているアルブミン、大きな血清タンパク質（67 kDa）の存在を示し、このことは、BBB透過性（BBBの相対的な「漏出しやすさ」）の増大を示す。

【0618】

治療後の脳腫瘍中のHAの量の評価のために、脳切片をビオチン標識ヒアルロナン結合性タンパク質（HABP-bio）（Seikagaku、Japan）とともにインキュベートした。洗浄して一次試薬を除去した後、二次試薬としてFITC標識ストレプトアビジン（Vector Labs、Canada）を使用した。核を、DAPI（4',6-ジアミジノー2-フェニルインドール）試薬を使用して対比染色した。ヘマトキシリン/エオシン染色も行い、脳中の腫瘍を同定した。Insight FireWire
デジタルカメラ（Diagnostic Instruments、Michigan）と連動したNikon Eclipse TE2000U顕微鏡または同じ画像取得システムを有するLeitzオーバーヘッド顕微鏡によって顕微鏡写真を撮った。

10

【0619】

結果は、対照動物（APIバッファー）における強いHA染色を示したが、PEG化rHuPH20を用いて注射された動物では検出可能なHA染色は示さず、これは、この酵素を使用して、静脈内に投与された場合に脳腫瘍中のHAを低減できるということを示した。

【0620】

C. PEG化rHuPH20治療後の動物の生存

20

PEG化rHuPH20単独を用いる治療後の脳腫瘍モデル動物の生存を評価するために、20匹のPC3脳腫瘍モデルマウス（上記の実施例18Aに記載される）を注射後12日目に留めた。マウスに、5000酵素ユニット（U）のPEG化rHuPH20（10匹のマウス）またはAPIバッファー（10匹の対照マウス）のいずれかを用い、1週間に2回4週間の間、尾静脈に注射した。

【0621】

動物の生存率を、動物の死亡をモニタリングすることによって経時的にモニタリングした。図10に示される結果は、PEG化rHuPH20処理された動物および対照動物間の生存において有意な変化を示さなかった。

【0622】

30

D. 放射線療法を組み合わせたPEG化rHuPH20の生存に対する効果

放射線と組み合わせたPEG化rHuPH20を用いる治療後の脳腫瘍モデル動物の生存を評価するために、3群のPC3脳腫瘍モデルマウス（上記の実施例18Aに記載される）を使用した。

【0623】

この研究のために、27匹の腫瘍を有するマウスを、接種後13日目の体重に基づいて3群（A、BおよびC）に段階分けした。各群のために、PC3細胞の接種後13日目に投薬を開始した。各治療／対照は、q3d×4投与計画（3日毎、合計4回）を使用して投与した。各投与で、群A、対照群は、100 μLのAPIバッファー単独の静脈内注射を投与された。群Bは、全脳照射（5 Gy）を用いて治療された。群C、併用療法群は、5000酵素ユニットのPEG化rHuPH20（100 μLのAPIバッファー中）と、それに続く4時間後の全脳照射（3 Gy）を用いて治療された。この投与計画は、以下の表39に示されている。

40

表39. 投与計画

【0624】

【表 4 0】

群	治療	投与量	経路	投与計画	動物の数
A	APIパツファ ー	100 μ l	iv	q3d x 4	9
B	放射線	3 Gy	WBR **	q3d x 4	9
C	放射線 PEGPH20*	3 Gy 5000 U	WBR iv	q3d x 4	9

* 放射線の4時間前に投与されるPEGPH20

** WBR、全脳照射

【0625】

各群における動物の生存を、動物の死亡をモニタリングすることによって経時的にモニタリングした。図11に、および表40に示される結果は、併用療法（放射線およびPEG化rHuPH20；群C）を用いて、対照（治療なし）を上回る生存の改善（最大45%延長した生存）を示し、併用療法（放射線およびPEG化rHuPH20；群C）を用いて、放射線単独（群B）を上回る生存の改善（最大10%延長した生存）を示した。

表 4 0

【0626】

【表 4 1】

群	治療	生存期間中央値	治療なし(陰性 対照)と比較し た延長生存%	単回放射線治療(陽 性対照)と比較した 延長生存%
A	API	45.5	N/A	N/A
B	放射線	60	31	N/A
C	放射線+PE GPH20	66	45	10

【実施例 1 9】

【0627】

動物におけるPEG化rHuPH20の薬物動態特性

薬剤の静脈内投与後いくつかの時点で血液サンプル中の血漿ヒアルロニダーゼを測定することによって、Harlan (Indianapolis, Indiana) から得たICRマウス、ラットおよびカニクイザルにおいて、PEG化rHuPH20（上記の実施例7に記載のとおりmPEG-SBA-30Kを用いて製造された）の薬物動態特性を評価した。

【0628】

マウスでは、70時間の期間にわたって研究を実施した。この研究の「時間0」で、各々19～25グラムの体重のHarlanから得た雌のICRマウスに、0.5mg/mlに希釈された約3000Uの精製PEG化rHuPH20を用い、片側尾静脈を介して注射した。ほとんどの場合には、後の評価のために、治療の5分後、ガラス毛細血管によって後眼窩神経叢から血液を採取した。次いで、動物をそのケージに戻した。PEG化rHuPH20の投与後、種々の時点で、5%イソフランを用いて短時間麻酔されている動物から、ガラス毛細血管によって後眼窩神経叢から血液サンプルを採取した。各サンプルから得た血液を、凝固を防ぐために紫色のキャップのMicrotainer採血管中でEDTAと混合した。この管を、卓上遠心機で5000rpmで15分間遠心分離し、血漿を、新しいエッペンドルフ管に移した。血漿を-20℃で凍結し、その後、アッセイしてヒアルロニダーゼ活性を決定した。

【0629】

種々の時点で血漿ヒアルロニダーゼ活性を決定するために、上記の実施例2に記載され

10

20

30

40

50

るような標準マイクロ濁度プレートアッセイを血漿で実施し、血漿中のヒアルロニダーゼ活性の量を測定した。マウスでは少ない総血液容積のために、研究の過程にわたって、動物あたり2または3回の採血しか実施しなかった。したがって、全経時的推移にわたって複数の動物に薬物動態曲線をフィッティングさせた。PK曲線フィッティングは、GraphPad Prism（登録商標）（GraphPad Software、Inc.、La Jolla、CA）ソフトウェアまたはWinNonLinソフトウェア（Pharsight（登録商標）Corporation、Mountain View、CA）のいずれかを使用して行った。

【0630】

同様の研究を、ラットおよびカニクイザルで実施した。ラットでは、96時間の期間にわたって研究を実施した。マウスについて上記で記載されたものと同様の研究では、ラットに125,000 U/kg（約4 mg/kg）のPEG化rHuPH20を投与した。種々の時点で、上記の実施例2に記載されるような標準マイクロ濁度プレートアッセイを使用して血漿ヒアルロニダーゼ活性をモニタリングした。時点あたり、3匹のラットを評価した。カニクイザルでは、PEG化rHuPH20が、0.5、2.0および6.0 mg/kgの段階的に増大する用量で2匹の雌ザルに投与されるMPI28日静脈内用量研究を実施した。サルすべてのPEG化rHuPH20を排除させ、その後、その後の投薬を行った。上記の実施例2に記載されるような標準マイクロ濁度プレートアッセイを使用して、96時間にわたって種々の時点で血漿ヒアルロニダーゼ活性をモニタリングした。マウス、ラットおよびカニクイザルのPEG化rHuPH20の静脈内用量比較が、表41に示されている。

表41

【0631】

【表42】

種	経路	用量
マウス	IV	100000 U/マウス
ラット	IV	125000 U/kg 85000 U/kg 56077 U/kg
カニクイザル	IV	15000 U/kg (0.5 mg/kg) 60000 U/kg (2.0 mg/kg) 180000 U/kg (6.0 mg/kg)

【0632】

薬物動態回帰曲線を、導かれたデータにフィッティングし、GraphPad Prism（登録商標）（GraphPad Software、Inc.、La Jolla、CAで、以下の方程式を使用して血漿半減期（ $T_{1/2}$ ）を決定した。

【0633】

血漿半減期は、非線形回帰のためのPrismソフトウェアを使用して決定した。静脈内注射後の半減期曲線フィッティングのための標準化した式は以下のとおりである：

$$C_p = C_0 \exp(-k_{e1})t$$

（式中、 $k_{e1} = 0.693 / T_{1/2}$

t = 被験物質投与後の時間

C_0 は、理論上の出発値であり、

C_p は、時間 t での測定値である）。

【0634】

以下の方程式を使用した：

一成分指数関数的減衰：

$$Y = \text{スパン}1 * \exp(-k_{e1}X) + \text{プラトー}；$$

（式中、 k_{e1} は、 $0.693 / T_{1/2}$ に相当する崩壊率定数であり、プラトーは、

崩壊が無限に近づくときの漸近値である)。

二成分指数関数的減衰：

$Y = \text{スパン1} * \exp(-k_{1e} X) + \text{スパン2} * \exp(-k_{2e} X) + \text{プラトー}$ ；

(式中、 k_{1e} および k_{2e} は、スパン1 およびスパン2 それぞれの崩壊率定数であり、プラトーは、崩壊が無限に近づくときの漸近値である)。

【0635】

濃度－時間データの2コンパートメントモデリングによって導かれた上記の研究の結果が、以下の表42に示されており、ここで、PKパラメータの説明は、表43に示されており、 $T_{1/2\alpha}$ は、分布相半減期であり、 $T_{1/2\beta}$ は、排出相半減期であり、MRTは、平均滞留時間である。マウスでは、血漿中の酵素の α 相(分布相)半減期および β 相(排出相)半減期は、それぞれ、0.696時間および19.23時間であった。マウスにおける結果は、図12に示されており、ここで、血漿ヒアルロニダーゼの初期の迅速な分解(分布相)、続いて、経時的な遅い段階的な減衰(排出相)が観察された。ラットでは、血漿中の酵素の α 相(分布相)半減期および β 相(排出相)半減期は、それぞれ、1.13時間および7.48時間であった。カニクイザルでは、血漿中の酵素の α 相(分布相)半減期および β 相(排出相)半減期は、それぞれ、1.13時間および21.75時間であった。

表42. マウス、ラットおよびカニクイザルにおけるPEG-rHuPH20の中央値PKパラメータ(濃度－時間データの2コンパートメントモデリングによって導かれた)

【0636】

【表43】

	マウス	ラット	カニクイザル
体重 (kg)	0.026	0.292	1.920
BSA (m ²)	0.0079	0.0419	0.1539
V ₁ (mL/kg)	38.44	72.00	55.83
k ₁₀ (1/hr)	0.161	0.384	0.046
k ₁₂ (1/hr)	0.65	0.15	0.31
k ₂₁ (1/hr)	0.22	0.15	0.40
CL(mL/h-kg)	6.20	30.33	2.54
CL ₂ (mL/h-kg)	24.91	11.52	17.60
V ₂ (mL/kg)	112.03	85.66	17.63
T _{1/2} α (h)	0.696	1.13	1.13
T _{1/2} β (h)	19.23	7.48	21.75
MRT (h)	24.32	5.81	30.76

表43. PKパラメータの説明

【0637】

【表44】

PKパラメータ	説明
CL ₁	中枢コンパートメントからのクリアランス(mL/h-kg)
CL ₂ or Q _D	分布速度(mL/h-kg)
k ₁₀	排出速度定数(h ⁻¹)
k ₁₂	中枢から末梢コンパートメントへの分布速度定数(h ⁻¹)
k ₂₁	末梢から中枢コンパートメントへの分布速度定数(h ⁻¹)
V ₁	中枢コンパートメントの容量(mL/kg)
V ₂	末梢コンパートメントの容量(mL/kg)

10

20

30

40

50

【実施例 20】

【0638】

PEGPH20の単回用量静脈内投与後の血漿ヒアルロニダーゼレベルの薬物動態分析
PEGPH20の単回用量投与後に、Harlan (Indianapolis, Indiana) から得たICRマウスで、またスプラーグドーリーラット (Harlan) で、薬物動態 (PK) 研究を実施した。以下に記載されるようにPEGPH20の注射後、実施例2に記載されるような改変した比濁 (turbidometric) アッセイを使用して、ヒアルロニダーゼ活性を測定することによってPEGPH20の血漿レベルを決定した。手短には、ヒアルロニダーゼを含有する血漿サンプルをヒアルロネート (HA) とともに60分間インキュベートした。酸性化血清の添加で、未消化のHAを沈殿させた。30分の発生期間の後、得られたサンプルの濁度を640nmで測定し、得られた濁度は、存在するヒアルロニダーゼ活性の尺度であった。アッセイは、血漿中の、通常、酸性pHで活性を示す内因性リソソームヒアルロニダーゼ活性を抑制するpH条件下で実施した。PEGPH20濃度は、校正曲線から補間されるようなヒアルロニダーゼ活性のユニット (U) /mLとして、またはPEGPH20ロットの比活性 (U/mg) を使用して算出された $\mu\text{g}/\text{mL}$ として表した。通常、ラットについては、低レベルの定量化は、10U/mLであり、アッセイは、最大100U/mLのヒアルロニダーゼ活性を測定することに適用できる。

10

【0639】

A. マウス

20

雄のICRマウス (3匹/群) に、PEGPH20の単回IV用量 (125, 000U/kg; 3.3mg/kg) を投与し、用量後、5分から24時間の選択された間隔で血漿サンプルを採取した。上記のように、血漿サンプルを、ヒアルロニダーゼ活性について分析した。結果は、IV注射後、PEGPH20の血漿濃度は、二相性に低下することを示す。初期の迅速な減少は、全身循環からの分布を表し、排出相を表す遅い減少が続いた。経時的なヒアルロニダーゼ活性の非コンパートメント解析から導かれた薬物動態パラメータは、表44に示されている。値は、非コンパートメント解析を使用して3匹のマウスから得た平均データである。このデータは、PEGPH20の消失半減期 ($t_{1/2\lambda z}$) は、約10時間であったことを示す。平均分布容積 (V_z) は、約122mL/kgであり、これは、マウスにおいて予想された血漿容量 (すなわち、50mL/kg; Davies and Morris 1993) の約2倍であり、このことは、PEGPH20は、末梢組織まで広くは分布されなかったということを示唆する。

30

【0640】

【表 4 5】

表44: 雄マウスへのPEGPH20の単回IV用量(125,000U/kg;3.3mg/kg)投与後の平均PKパラメータ	
PKパラメータ	値
C_0 (U/mL)	1,898
C_0 (μ g/mL)	50.0
C_{max} (U/mL)	1,727
C_{max} (μ g/mL)	45.5
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	10.3
$AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL)	15,244
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/mL)	401
V_z (mL/kg)	121.8
V_{ss} (mL/kg)	109.7
CL (mL/h·kg)	8.2
MRT (h)	13.4

10

20

PK = 薬物動態 ; U = 酵素活性の単位 ; IV = 静脈内に ; C_0 = 時間 0 に逆推定された血漿濃度 ; C_{max} = 最大の観察された血漿濃度 ; $t_{1/2\lambda z}$ = 終末相半減期 ; $AUC_{0-\infty}$ = 時間 0 から推定される無限への血漿濃度対時間曲線下の面積 ; V_z = 分布容積 ; V_{ss} = 定常状態での分布容積 ; CL = 完全クリアランス ; MRT = 平均滞留時間

【0641】

B. ラット

雄のスプラグードーリーラット (3匹/群) に、PEGPH20の単回IV用量 (125,000U/kg; 3mg/kg) を投与し、用量後5分~96時間の選択した間隔で血漿サンプルを採取した。上記のように、ヒアルロニダーゼ活性について、血漿サンプルを分析した。結果は、IV注射後、PEGPH20の血漿濃度は二相性に低下したことを示す。初期の迅速な低下は、全身循環からの分布を表し、排出相を表す遅い減少が続いた。経時的なヒアルロニダーゼ活性の非コンパートメント解析から導かれた薬物動態パラメータは、表45に示されている。値は、非コンパートメント解析を使用して3匹のラットから得た平均データである。このデータは、PEGPH20の消失半減期 ($t_{1/2\lambda z}$) は、約8時間であり、マウスにおいて見られたものよりも迅速であったことを示す。これはまた、マウスにおいて観察されたものよりも短い平均滞留時間 (MRT) および速い完全クリアランス (CL) にも反映された。平均分布容積 (V_z) は、約296mL/kgであり、これは、ラットにおいて予想された血漿容量 (すなわち、31mL/kg; Davies and Morris 1993) よりも多く、ラットにおいて予想された細胞外液容量に近似する (すなわち、297 mL/kg; Davies and Morris 1993) 。

30

40

【0642】

【表 4 6】

表45: 雄ラットへのPEGPH20の単回IV用量(125000U/kg;3mg/kg)投与後	
PKパラメータ	値
C_0 (U/mL)	1,228
C_0 (μ g/mL)	30.0
C_{max} (U/mL)	1,256
C_{max} (μ g/mL)	30.6
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	7.7
$AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL)	4,713
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/mL)	115
V_z (mL/kg)	296.1
V_{ss} (mL/kg)	174.9
CL (mL/h·kg)	26.6
MRT (h)	6.6

10

PK = 薬物動態 ; U = 酵素活性の単位 ; IV = 静脈内に ; C_0 = 時間 0 に逆推定された血漿濃度 ; C_{max} = 最大の観察された血漿濃度 ; $t_{1/2\lambda z}$ = 終末相半減期 ; $AUC_{0-\infty}$ = 時間 0 から推定される無限への血漿濃度対時間曲線下の面積 ; V_z = 分布容積 ; V_{ss} = 定常状態での分布容積 ; CL = 完全クリアランス ; MRT = 平均滞留時間

20

【0643】

C. 概要

マウスおよびラットにおける単回静脈内用量研究では、血漿ヒアルロニダーゼ活性は二相性に低下し、迅速な初期分布相および遅い排出相を有していた。平均排出半減期 ($t_{1/2}$) は、マウスでは約 10 時間であり、ラットでは、8 時間であった。平均分布容積 (V_z) は、マウスについては 122 mL/kg であり、このことは、PEGPH20 は、マウスでは末梢組織まで広くは分布されなかったということを示唆する。ラットでは、平均 V_z は、296 mL/kg で高かった。

30

【実施例 21】

【0644】

カニクイザルにおける単回静脈内用量投与後の PEGPH20 の用量範囲および薬物動態研究

カニクイザルにおいて、種々の用量範囲で単回用量投与後の薬物動態 (PK) 研究を実施した。以下に記載されるように、PEGPH20 の注射後、実施例 20 記載されるような改変した比濁アッセイを使用して、ヒアルロニダーゼ活性を測定することによって PEGPH20 の血漿レベルを決定した。ラットと同様に、低レベルの定量化は、10 U/mL であり、アッセイは、最大 100 U/mL のヒアルロニダーゼ活性を測定することに適用できる。

40

【0645】

雄のカニクイザル (1~5 匹/群) に、1 mg/kg (38,000 U/kg)、3 mg/kg (114,000 U/kg)、6 mg/kg (228,000 U/kg)、12.5 mg/kg (412,500 U/kg) および 33 mg/kg (1,089,000 U/kg) の範囲の濃度で PEGPH20 の単回 IV 用量を投与し、用量後 0.5~7.2 時間の選択された間隔で血漿サンプルを採取した。血漿サンプルを、ヒアルロニダーゼ活性について上記のように分析した。結果は、血漿濃度の低下は、用量後 0.5 時間の最初の PK 血液採取時間について迅速な分布相が獲得されなかったので単相性であったということを示す。経時的なヒアルロニダーゼ活性の非コンパートメント解析から導かれた薬物

50

動態パラメータが、表 4 6 に示されている。値は、表に示されるような非コンパートメント解析を使用して 1 ～ 5 匹のサルから得た平均データである。

【0646】

このデータは、PEGPH20 の消失半減期 ($t_{1/2\lambda z}$) が、39 ～ 53 時間 (1.6 ～ 2.2 日) の範囲であったことを示す。長い半減期は、約 1.0 mL/h kg の遅い全身クリアランスに起因した。IV 注射の直後の時間への逆推定によって決定されるような最大血漿濃度 [C_0]、終末相排出速度 $k_{\lambda z}$ および完全クリアランス (CL) は、分布容積の推定 (V_z) を提供した。平均 V_z の範囲は、70 ～ 93 mL/kg であり、これは、サルにおいて予想された血漿容量 (すなわち、45 mL/kg; Davies and Morris 1993) の約 2 倍あり、これは、PEGPH20 は末梢組織まで広くは分布されなかったということを示唆した。

10

【0647】

血漿濃度－時間曲線下の面積、推定された最大濃度 [C_0] および観察された C_{max} を使用して用量線形性を調べた。対数変換した PK パラメータの、対数変換した IV 用量との相関は、1.0 に等しい傾きを有する直線関係を示し、このことは、サルにおける PEGPH20 の PK は、用量に対して直線であるということを示唆した。全身曝露および観察された最大血漿濃度は、用量の増大とともに比例的に増大した。

【0648】

【表 4 7】

表46: 雄サルへのPEGPH20の単回IV用量投与後の平均PKパラメータ					
	値				
用量 (U/kg):	38,000	114,000	228,000	412,500	1,089,00
用量 (mg/kg):	1	3	6	12.5	33
N:	3	3	5	1	1
PKパラメータ					
C_0 (U/mL)	813	1,653	4,558	6,320	18,601
C_0 (μ g/mL)	21.4	43.5	119.9	191.5	563.7
C_{max} (U/mL)	712	1,763	4,503	5,770	17,084
C_{max} (μ g/mL)	18.8	46.4	118.5	174.9	517.7
$t_{1/2\lambda z}$ (h)	39.7	49.1	41.0	53.2	52.3
$AUC_{0-\infty}$ (U·h/)	23,654	88,630	195,117	372,399	961,009
$AUC_{0-\infty}$ (μ g·h)	622	2,332	5,135	11,285	29,121
V_z (mL/kg)	92.5	92.8	70.0	85.0	85.6
V_{ss} (mL/kg)	81.7	86.6	66.2	81.2	81.7
CL (mL/h·kg)	1.6	1.4	1.2	1.1	1.1
MRT (h)	50.9	66.6	56.0	73.3	72.1

20

30

40

PK = 薬物動態; U = 酵素活性の単位; IV = 静脈内に; C_0 = 時間 0 に逆推定された血漿濃度; C_{max} = 最大の観察された血漿濃度; $t_{1/2\lambda z}$ = 終末相半減期; $AUC_{0-\infty}$ = 時間 0 から推定される無限への血漿濃度対時間曲線下の面積; V_z = 分布容積; V_{ss} = 定常状態での分布容積; CL = 完全クリアランス; MRT = 平均滞留時間

【0649】

概要

サルにおける単回静脈内用量研究では、血漿ヒアルロニダーゼ活性は、二相性に低下し、迅速な初期分布相および遅い排出相を有していた。平均排出半減期 ($t_{1/2}$) は、サル

50

では約40～53時間であった。平均分布容積 (V_z) は、サルについては70～93 mL/kgであり、このことは、PEGPH20は、末梢組織まで広くは分布されなかったということを示唆する。PEGPH20のいくつかの用量レベルを評価するサル研究では、最大の観察された血漿濃度 (C_{max}) および血漿濃度対時間の曲線下面積 (AUC) は、PEGPH20用量の増大につれて直線的に増大した。

【実施例22】

【0650】

反復された用量

PEGPH20の反復用量投与後に、スプラーグドーリーラット (Harlan) およびカニクイザルにおいて、薬物動態 (PK) および／または毒性学 (TK) 研究を実施した。実施例20に記載のとおり血漿ヒアルロニダーゼレベルを決定した。

10

【0651】

A. ラット

PEGPH20のIV投与後に、スプラーグドーリーラットにおいて4週間の反復用量毒性研究を実施した。3ラット／性別／群の4群に、ビヒクル (10 mM Hepes pH 7.0 + 130 mM NaCl) または0.5、5もしくは25 mg/kgのPEGPH20の週に2回の用量をそれぞれ、4連続週間、静脈内に投与した。1日目および25日目に、投与後所定の時間で各動物から血液サンプルを採取した。血漿サンプルを、実施例20に記載されるようにヒアルロニダーゼ活性について分析した。各IV用量の毒物動態学パラメータは、血漿濃度対時間データの非コンパートメントモデリングを使用して導いた。導かれたTKパラメータは、表47に示されている。PEGPH20の週に2回のIV用量投与後の血漿濃度対時間の分析によって、曝露 (C_{max} およびAUC) は、PEGPH20用量の増大につれて増大することが示された。薬物動態学は、評価された用量の範囲にわたってほぼ直線であった。消失半減期 ($t_{1/2}$) は、PEGPH20用量の増大につれて増大した。曝露は、概して、任意の所与の用量レベルおよび投薬日について性別間で同様であった。PEGPH20の反復されたIV投薬後、5 mg/kgおよび25 mg/kg用量群において、1日目と比較して、25日目にAUCの増大に向かう傾向があった。しかし、25日目AUC曝露は、任意の所与の用量群内で、1日目に観察された曝露の<2倍のままであった。 C_{max} によって決定される曝露は、概して、任意の所与の用量群内で1日目から25日目まで一貫したままであった。

20

30

【0652】

【表 4 8】

表47: 4連続週間のラットへのPEGPH2Oの週に2回のIV投与後の平均TKパラメータ						
パラメータ	0.5 mg/kg		5 mg/kg		25 mg/kg	
	1日目	25日目	1日目	25日目	1日目	25日目
雄						
C _{max} (U/mL)	174	203	1,760	2,490	11,500	10,900
t _½ (h)	2.90	3.28	8.71	23.9	12.6	24.0
AUC _{0-t} (U・h/mL)	674	695	12,000	20,700	100,000	195,000
C _{max} 曝露比(25日目のC _{max} /1日目のC _{max})	1.17		1.41		0.95	
AUC曝露比(25日目のAUC _{0-t} /1日目のAUC _{0-t})	1.03		1.73		1.95	
雌						
C _{max} (U/mL)	196	171	1,830	1,960	10,300	10,100
t _½ (h)	2.42	3.75	9.43	13.3	11.6	21.1
AUC _{0-t} (U・h/mL)	491	608	10,300	13,400	105,000	154,000
C _{max} 曝露比(25日目のC _{max} /1日目のC _{max})	0.87		1.07		0.98	
AUC曝露比(25日目のAUC _{0-t} /1日目のAUC _{0-t})	1.24		1.30		1.47	
C _{max} 性別比(C _{max} (雄)/C _{max} (雌))	0.89	1.19	0.96	1.27	1.12	1.08
AUC性別比(AUC _{0-t} (雄)/AUC _{0-t} (雌))	1.37	1.14	1.17	1.54	0.95	1.27

TK = 毒物動態学 ; IV = 静脈内に ; U = 酵素活性の単位 ; C_{max} = 最大の観察された血漿濃度 ; $t_{1/2}$ = 消失半減期 ; AUC_{0-t} = 時間 0 から最後に測定した時点の血漿濃度対時間曲線下面積

【0653】

週に2回のIV投与は、ラットにおいて耐容性良好であった。体重の一時的な減少があり、これは、投薬期間 (period) の最後までに研究前の値に向かって戻った。この効果は、細胞外ヒアルロナンおよびその結合している水の減少のようなPEGPH20薬理学に起因する。プロトンポンプ時間に変更されなかったが、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の中程度の延長があった。調べられた任意の組織において、剖検で、または顕微鏡によって、激しく行われた出血は観察されなかった。したがって、APTT延長は、ラットにおける有害事象であったという評価のために、最大無毒性量 (NOAE

L) は、ラットでは 5 mg/kg / 用量として規定された。摂餌量または挙動に変化は観察されなかった。その他の被験物質関連知見が観察されなかったので、観察された延長された APTT を除いて、 25 mg/kg / 用量が、指定された NOAEL であるだろう。

【0654】

B. サル

1. 反復用量毒性研究

雌のカニクイザル ($N=3$) に、研究日 1、3、8、11、15、22、25 および 29 に 6 mg/kg ($198,000 \sim 222,000 \text{ U/kg}$) の IV 用量の PEGPH20 を投与した。血漿サンプルを、用量後 0.083～96 時間の選択された間隔で、1、3、8、11 および 25 日目に採取した。血漿サンプルを、実施例 20 に記載されるようなマイクロ濁度プレートアッセイを使用してヒアルロニダーゼ活性について分析した。各 IV 用量の毒物動態学パラメータは、血漿濃度対時間データの非コンパートメントモデリングを使用して導いた。各用量は、それまでの連続用量とは独立にモデリングした。結果は、表 48 に示されている。雌のサルへの PEGPH20 の反復 IV 用量投与後の血漿濃度対時間データの TK 分析は、 6 mg/kg (約 $210,000 \text{ U/kg}$) の用量の PEGPH20 の IV 注射後の血漿濃度の低下が二相性であることを示した。時間とともに、濃度の迅速な初期低下と、それに続く、濃度の遅い低下があった。分布容積 (V_z) の推定は、PEGPH20 は、末梢組織まで広くは分布されなかったということを示唆した。PEGPH20 の全身クリアランスは、遅く、研究日 1、3、8 および 11 に決定されたような $0.9 \sim 1.6 \text{ mL/h-kg}$ の範囲の平均速度を有していた。遅いクリアランスは、長い消失半減期 ($t_{1/2\lambda z}$) の一因であった。PEGPH20 の観察された平均消失半減期 ($t_{1/2\lambda z}$) は、28～64 時間 (1.2～2.7 日) の範囲であった。研究日 25 日に、3 匹のうち 2 匹の動物において、PEGPH20 の加速されたクリアランスが観察された。研究日 25 に採取された血漿サンプルを、再アッセイして、PEGPH20 濃度を確認し、平均濃度を報告した。

10

20

【0655】

【表 49 - 1】

表48: 雌サルへのPEGPH20(6mg/kg;約210,000U/kg)の反復IV用量投与後のTK						
TKパラメータ	動物数	日数				
		1	3	8	11	25
C ₀ (U/mL)	1	5,044	4,915	4,395	5,170	4,209
	2	5,090	5,722	3,245	3,142	4,233
	3	4,338	ND	3,517	4,649	5,851
	平均	4,824	5,319	3,719	4,320	4,765
C ₀ (μ g/mL)	1	144.1	140.4	125.6	147.7	120.3
	2	145.4	163.49	92.7	89.8	121.0
	3	123.9	ND	100.5	132.8	167.2
	平均	137.8	152.0	106.3	123.4	136.1
C _{max} (U/mL)	1	4,762	4,620	4,002	4,836	4,006
	2	4,986	5,361	3,578	3,038	4,070
	3	4,143	ND	3,243	4,309	5,832
	平均	4630	4,991	3,608	4,061	4,636
C _{max} (μ g/mL)	1	136.1	132.0	114.3	138.2	114.5
	2	142.5	153.2	102.2	86.8	116.3
	3	118.4	ND	92.7	123.1	166.6
	平均	132.3	142.6	103.1	116.0	132.5
t _½ λ _z (h)	1	33.4	40.7	66.6	48.9	10.0
	2	30.2	49.0	62.3	63.4	14.0
	3	33.7	ND	63.8	51.3	60.2
	平均	32.5	44.8	64.2	54.5	28.1
AUC _{0-∞} (U·h/mL)	1	140,017	207,696	209,290	169,919	62,524
	2	147,554	269,928	234,010	169,380	67,016
	3	135,337	ND	159,178	153,185	366,06
	平均	140,969	238,812	200,826	164,162	165,20
AUC _{0-∞} (μ g·h/mL)	1	4,000	5,934	5,980	4,855	1,786
	2	4,216	7,712	6,686	4,839	1,915
	3	3,867	ND	4,548	4,377	10,459
	平均	4,028	6,823	5,738	4,690	4,720
V _z (mL/kg)	1	76.5	62.7	101.9	92.1	45.8
	2	65.6	58.2	85.2	119.9	59.6
	3	79.8	ND	128.4	107.2	47.0
	平均	74.0	60.4	105.2	106.4	50.8

10

20

30

40

【表 4 9 - 2】

V_{ss} (mL/kg)	1	75.8	61.5	99.4	90.1	49.8
	2	64.9	57.2	83.9	118.6	58.9
	3	79.8	ND	124.9	104.8	46.3
	平均	73.5	59.3	102.7	104.5	51.6
CL (mL/h·kg)	1	1.59	1.07	1.06	1.31	3.17
	2	1.50	0.82	0.95	1.31	2.95
	3	1.64	ND	1.39	1.45	0.54
	平均	1.58	0.95	1.13	1.36	2.22
MRT (h)	1	47.8	57.5	93.7	69.0	15.7
	2	43.1	69.5	88.4	90.5	19.9
	3	48.6	ND	89.6	72.3	85.6
	平均	46.5	63.5	90.6	77.3	40.4

10

TK = 毒物動態学；IV = 静脈内に；U = 酵素活性の単位； C_0 = 時間 0 に逆推定された血漿濃度；ND = 決定されず； C_{max} = 最大の観察された血漿濃度； $t_{1/2}$ λ_z = 終末相半減期； $AUC_{0-\infty}$ = 時間 0 から推定される無限への血漿濃度対時間曲線下の面積； V_z = 分布容積； V_{ss} = 定常状態での分布容積；CL = 完全クリアランス；MRT = 平均滞留時間

20

【0656】

2. 4 週間の反復静脈内用量毒性研究

PEGPH20 の IV 投与後、カンクイザルにおいて、4 週間の反復用量毒性研究を実施した。4 群のサル（性別あたり 4 匹であった 0.2 mg/kg/用量の PEGPH20 を投与された群を除いて、性別あたり 6 匹の動物）に、それぞれ、ビヒクル、0.2、2.0 または 10.5 mg/kg/用量の PEGPH20 の用量を 1 週間に 2 回、4 連続週間 IV 投与した。用量前、および用量後 0.5、1、2、4、8、12、24、48 および 72 時間で、1 日目および 25 日目に各動物から血液サンプルを採取した。用量前、および用量後 2 分で、4、8、11、15、18 および 22 日目に、さらなる血液サンプルを採取した。血漿サンプルを、実施例 20 に記載される比濁アッセイを使用してヒアルロニダーゼ活性について分析した。毒物動態学パラメータは、血漿濃度対時間データの非コンパートメントモデリングを使用して各 IV 用量について導いた。結果は、表 4 9 に示されている。4 連続週間のサルへの PEGPH20 の週に 2 回の IV 用量投与後の血漿濃度対時間データの TK 分析によって、曝露（ C_{max} および AUC）は、PEGPH20 用量の増大につれて増大するということが示された。薬物動態学は、評価された用量の範囲にわたってほぼ直線であった。消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は、PEGPH20 用量の増大につれて増大した。反復投与時に、 $t_{1/2}$ は、低用量および中用量の雄において低下した。低用量の曝露データも、反復投与で曝露が失われた動物を示した。曝露は、概して、任意の所与の用量レベルおよび投薬日について性別間で同様であった。PEGPH20 の反復された IV 投薬後、2 mg/kg および 10.5 mg/kg 用量群において、1 日目と比較して 25 日目に C_{max} および AUC の増大に向かう傾向があった。しかし、25 日目 AUC 曝露は、任意の所与の用量群内で、1 日目に観察された曝露の < 2 倍のままであった。PEGPH20 の曝露の喪失は、0.2 mg/kg 群において、研究日 25 の 8 匹の動物のうち 3 匹で観察された。

30

40

【0657】

【表 5 0】

表49: 4連続週間のサルへのPEGPH20の週に2回のIV投与後の平均TKパラメータ						
パラメータ	0.2 mg/kg		2 mg/kg		10.5 mg/kg	
	1日目	25日目	1日目	25日目	1日目	25日目
雄						
C _{max} (U/mL)	114	92.5	1,130	1,330	6,410	9,490
t _½ (h)	33.5	17.0	40.9	16.7	50.1	78.1
AUC _{0-t} (U・h/	2,750	1,790	32,500	36,200	225,000	429,00
C _{max} 曝露比(25 日目のC _{max} /1 日目のC _{max})	0.77		1.18		1.48	
AUC曝露比(25 日目のAUC _{0-t} / 1日目のAUC _{0-t})	0.65		1.11		1.91	
雌						
C _{max} (U/mL)	113	97.3	1,310	1,560	6,450	8,340
t _½ (h)	29.0	42.0	37.7	44.8	51.1	42.4
AUC _{0-t} (U・h/ mL)	2,650	1,680	35,600	56,300	230,000	332,00 0
C _{max} 曝露比(25 日目のC _{max} /1 日目のC _{max})	0.74		1.19		1.29	
AUC曝露比(25 日目のAUC _{0-t} / 1日目のAUC _{0-t})	0.61		1.58		1.44	
C _{max} 性別比(C _{m ax} (雄)/C _{max} (雌)	1.01	0.95	0.86	0.85	0.99	1.14
AUC性別比(A UC _{0-t} (雄)/AU C _{0-t} (雌))	1.04	1.07	0.91	0.64	0.98	1.29

TK = 毒物動態学 ; IV = 静脈内に ; U = 酵素活性の単位 ; C_{max} = 最大の観察された血漿濃度 ; $t_{1/2}$ = 消失半減期 ; AUC_{0-t} = 時間 0 から最後に測定した時点の血漿濃度対時間曲線下の面積

【0658】

週に2回のIV投与は、サルにおいて耐容性良好であった。ラット同様、体重の一時的な減少があり、これは、投薬期間の最後までに研究前の値に向かって戻った。ラットとは異なり、APTTの延長はなく、血液凝固パラメータの唯一の変化は、血漿フィブリノゲンの一時的な、用量依存的な増大に限定され、これは、PEGPH20投与に対する一時的な急性期応答と一致する。サルでは肢関節における変化が観察され、膝および肘において可動域が用量に関連して低下し、これは、投薬の休止後、部分的から完全な回復を示した。また、放射線検査によって観察される、単回高用量動物における軟組織量（骨格筋）

の中程度の減少があった。これは、組織からヒアルロナンおよびその結合している細胞外水を除く、PEGPH20の薬理学的効果と一致する。膝関節また骨格筋の関連する病理組織学的変化も、膝関節自体の異常なX線撮影知見もなかった。摂餌量または挙動の変化も観察されなかった。被験物質関連知見が観察されなかったので、10.5 mg/kg用量の高用量が、指定されたNOAELサルであった。

【0659】

C. 概要

6 mg/kg (約210,000 U/kg) 用量のPEGPH20が、29日の期間にわたって8回投与される、サルにおける反復IV用量では、曝露(平均 C_{max} およびAUC値によって評価されるような)は、研究期間にわたって同様であった。PEGPH20の全身クリアランス(CL)は遅く、0.9~1.6 mL/h/kgの平均速度を有していた。遅いクリアランスは、長い消失半減期の一因であり、これは、28~64時間(1.2~2.7日)の範囲であった。

【0660】

動物にPEGPH20をさまざまな用量で週に2回、4連続週間の間投与したラットおよびサルにおける毒性学研究は、曝露(C_{max} およびAUC値)は、用量の増大につれて直線的に増大し、消失半減期は用量の増大につれて増大することを示した。ラットにおける消失半減期の平均値は、約3時間(0.5 mg/kg用量)~24時間(25 mg/kg用量)の範囲であり、サルでは、17時間(0.2 mg/kg用量)~78時間(10.5 mg/kg用量)の範囲であった。兩種において、曝露は、概して、任意の所与の用量レベルおよび投薬日について性別間で同様であった。しかし、曝露の喪失が、0.2 mg/kg群において、25日目の8匹の動物のうち3匹で観察された。ラットでは、5 mg/kgおよび25 mg/kg用量群において、1日目と比較して25日目に、AUCの増大に向かう傾向があったが、それにもかかわらず、25日目AUC曝露は、任意の所与の用量群内で、1日目に観察された曝露の<2倍のままであった。ラットでは、 C_{max} によって決定される曝露は、概して、任意の所与の用量群内で1日目から25日目まで一貫したままであった。サルでは、2 mg/kgおよび10.5 mg/kg用量群において、1日目と比較して25日目に C_{max} およびAUCの増大に向かう傾向があった。ラットと同様に、サルにおける25日目AUC曝露は、任意の所与の用量群内で、1日目に観察された曝露の<2倍のままであった。

【実施例23】

【0661】

非比例的スケーリングモデル

実施例20に記載される、マウス、ラットおよびサルにおける単回用量静脈内薬物動態研究は、主として血管系内に保持される巨大分子に適用できる非比例的スケーリングモデルの基礎を築き、これを使用して、ヒトにおけるPEGPH20の薬理学的に活性な用量(PAD)および投薬頻度を推定した。PEGPH20の巨大分子の大きさのために(分子量は、100から270 kDaの間であると推定される)、小分子に使用される従来の種間スケーリング係数技術は、血管内コンパートメントに限定される分子には適用できない。

【0662】

マウス、ラットおよびサルにおいて観察されたPKパラメータから、パラメータを動物の体表面積に対して、また動物の体重に対して非比例的に拡大することによって非比例的モデリングを実施した。導かれた種間非比例的関係を使用して、ヒトの主要PKパラメータを算出/予測した。算出されたパラメータは、全身クリアランス(CL)、末梢クリアランス(CL_2)、中枢コンパートメントの容量(V_1)、末梢コンパートメントの容量(V_2)、中枢コンパートメントからの排出速度定数(k_{10})および中枢および末梢コンパートメント間の分布速度定数(k_{12} および k_{21})であった。IV用量の増大に伴う全身曝露の比例的増大を仮定して、ヒトにおけるPEGPH20の濃度-時間プロファイルを、1500、3,000、6,000、12,000、24,000および48,

000 U/kg の I V 用量レベルについて 2 コンパートメントモデルを用いてシミュレートした。月曜－木曜または月曜－金曜スケジュールの週に 2 回（B I W）の用量投与を調べ、 $\geq 1, 500 \text{ U/kg}$ ($50 \mu\text{g/kg}$) の臨床用量および月曜－木曜 B I W 用量スケジュールは、 $\geq 10 \text{ U/mL}$ の薬理的に有効な濃度を上回る閾値血漿濃度（C t r o u g h）を維持すると予測されるということを実証した。

【0663】

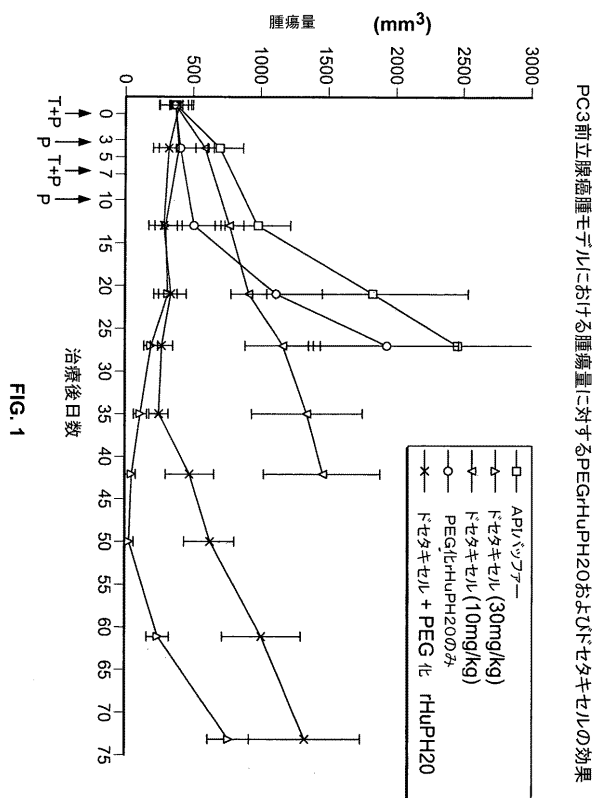
0.05 mg/kg のヒト用量は、ラットにおいて 5 mg/kg 用量レベルが N O A E L として定義された場合のげっ歯類の従来の 1/10 安全係数と一致する。サル研究における最低用量は、0.2 mg/kg であり、最高用量は、10.5 mg/kg であった。これら 2 種の用量レベルをそれぞれとり、有害事象と関連していることに注目して、0.05 mg/kg のヒト用量は、霊長類に投与される用量に対して 4 倍および 210 倍安全係数に相当する。

【0664】

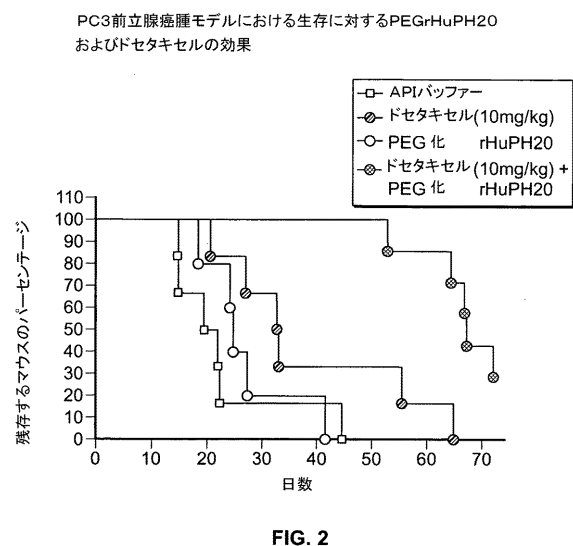
改変は、当業者には明らかであるので、本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されると意図される。

10

【図 1】



【図 2】



【図 4】

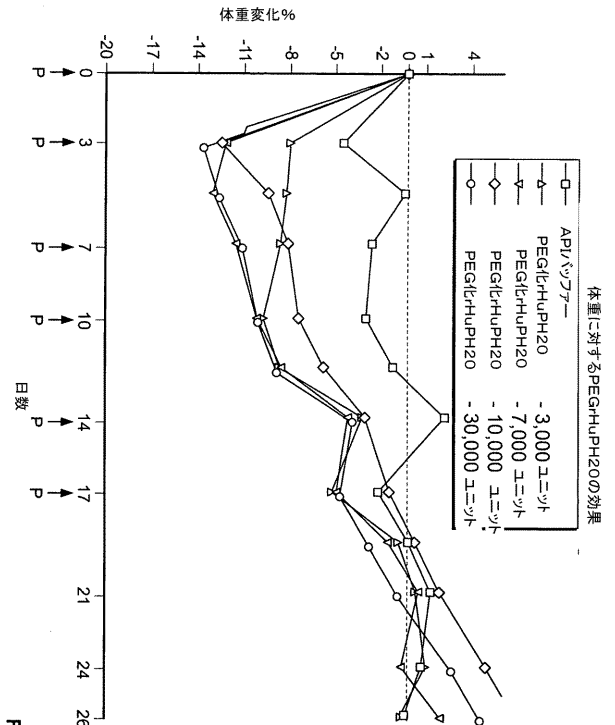


FIG. 4

【図 6】

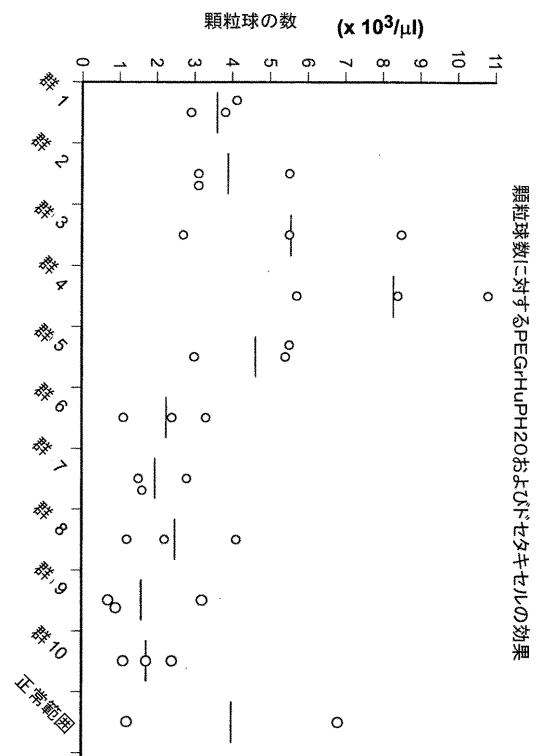


FIG. 6

【図 3】

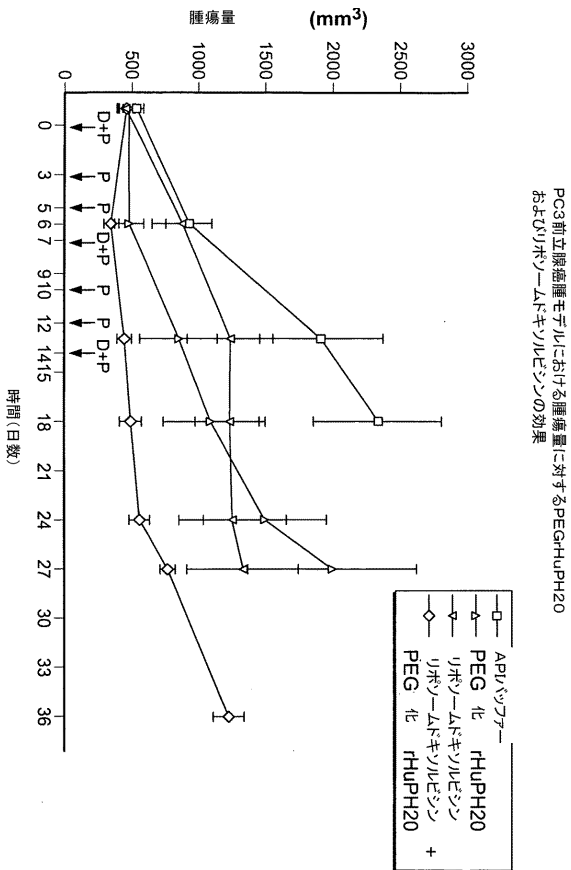


FIG. 3

【図 5】

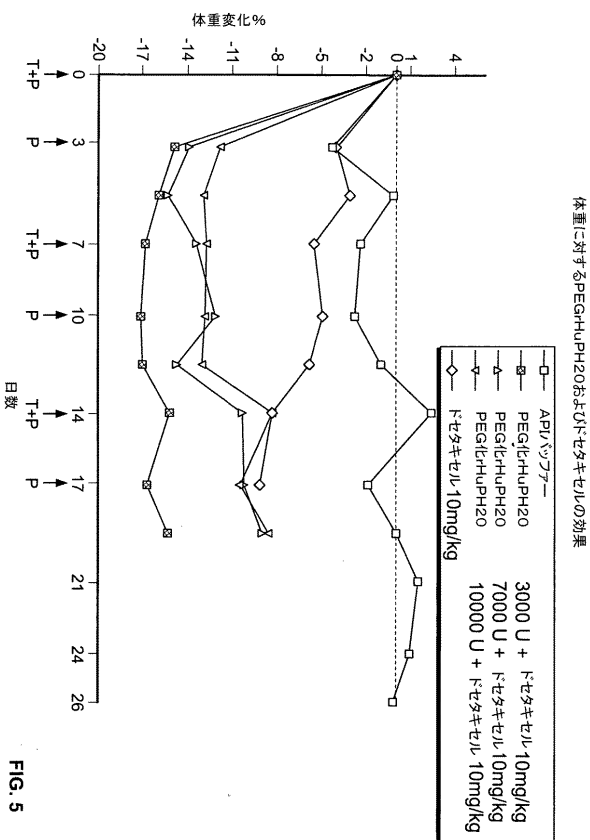
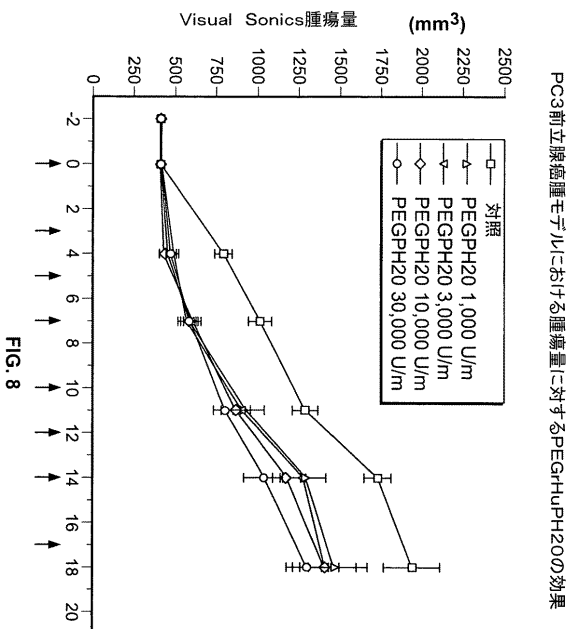
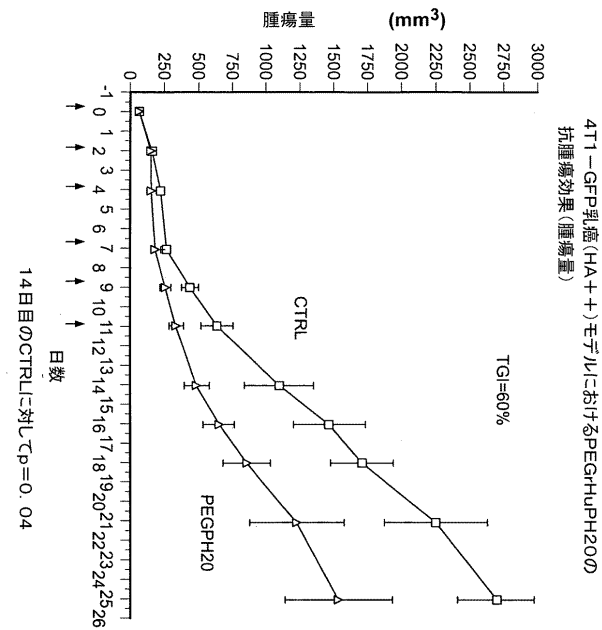


FIG. 5

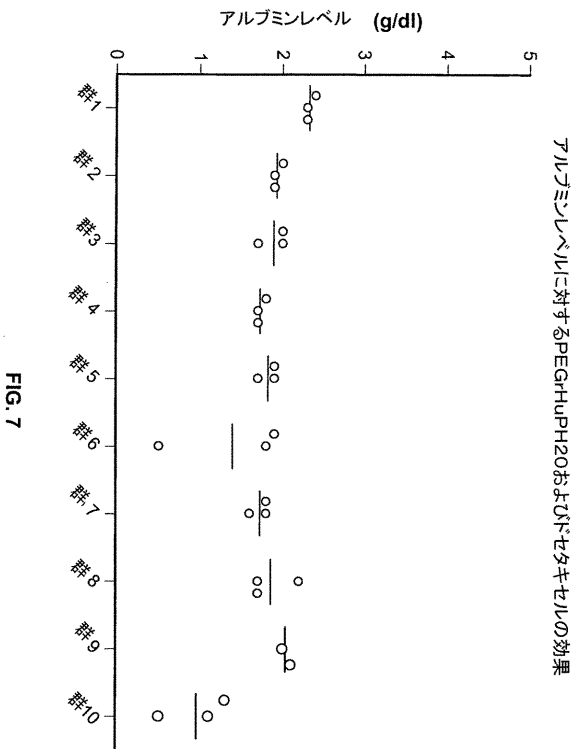
【図 8】



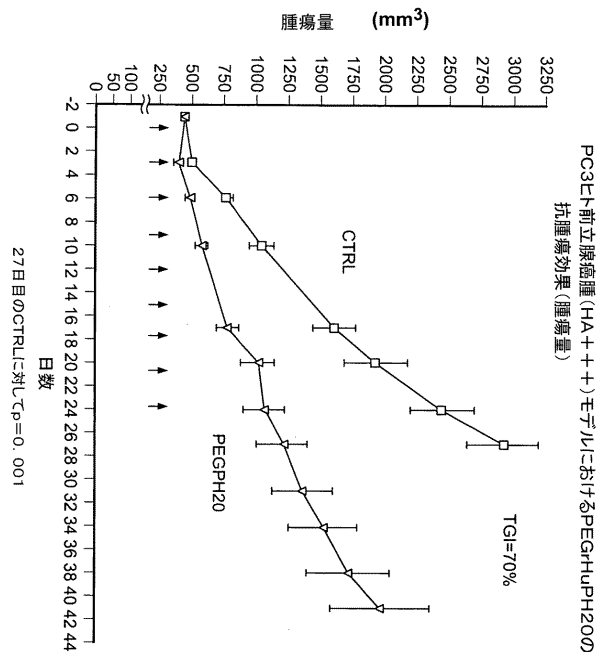
【図 9 B】



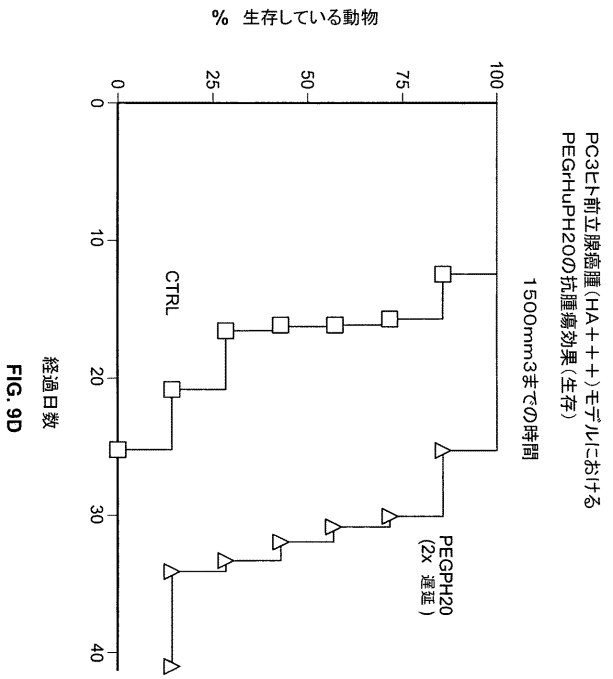
【図 7】



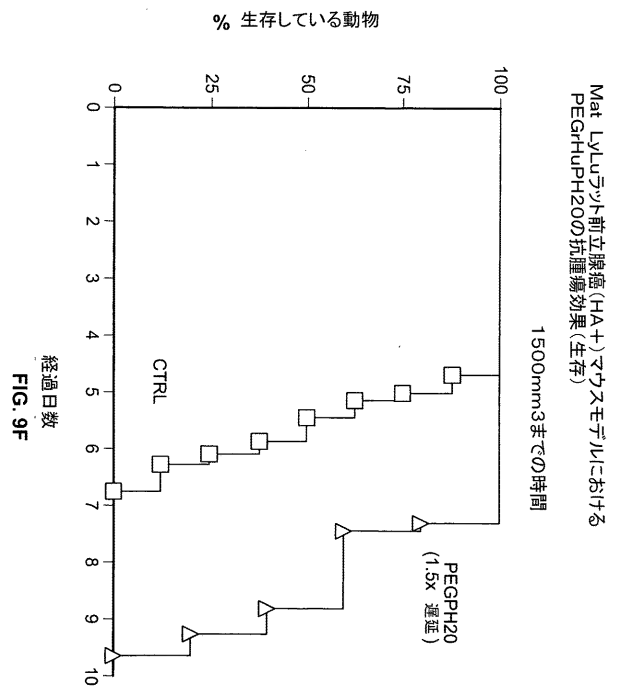
【図 9 A】



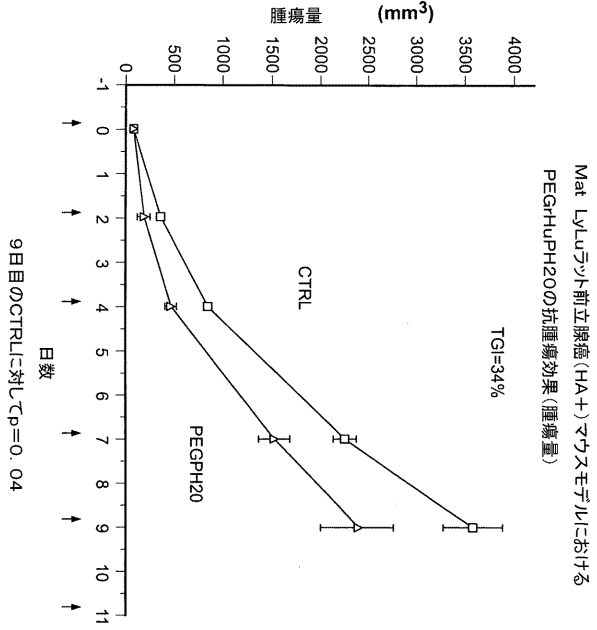
【図 9 D】



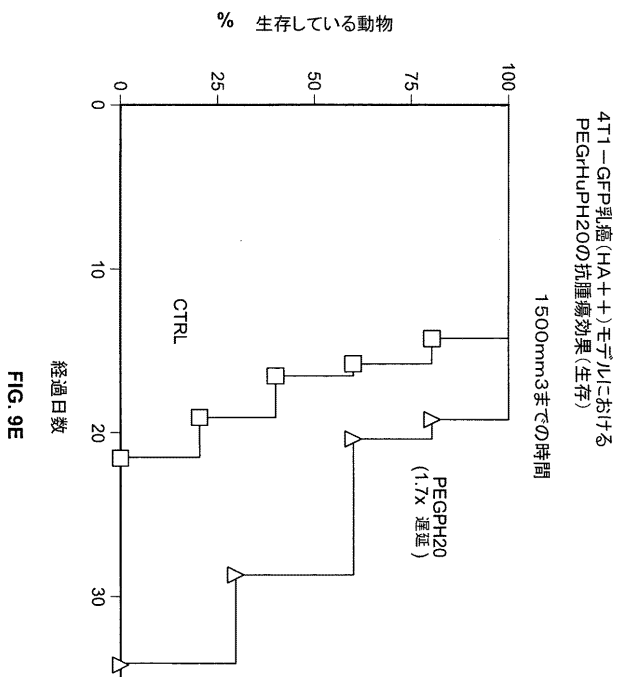
【図 9 F】



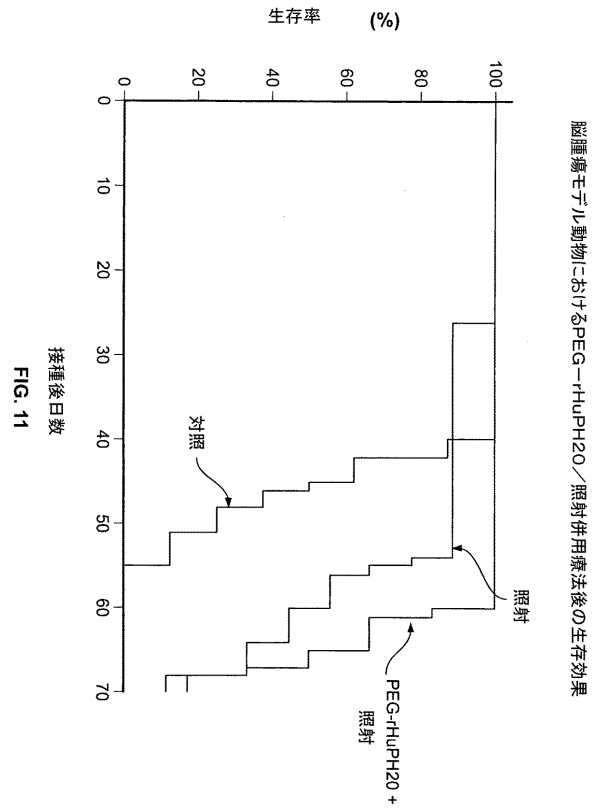
【図 9 C】



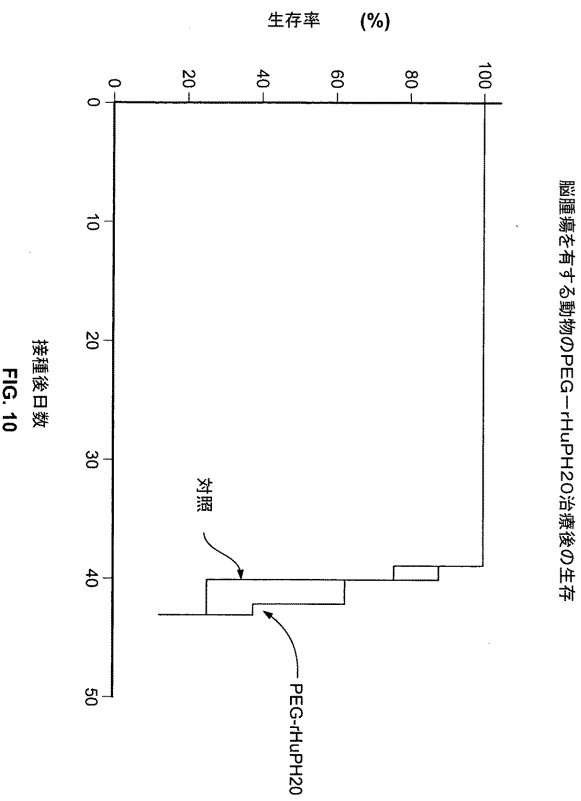
【図 9 E】



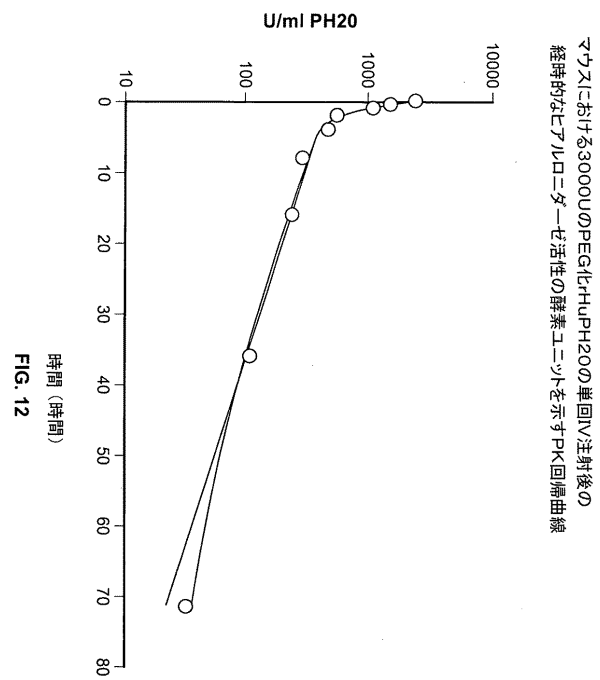
【図 1 1】



【図 1 0】



【図 1 2】



【配列表】

2011519361000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年12月14日(2010.12.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2011519361000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/002352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/47 C12N9/26 A61K31/337 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/091871 A (HALOZYME THERAPEUTICS INC [US]; BOOKBINDER LOUIS H [US]; KUNDU ANIRBAN) 31 August 2006 (2006-08-31) paragraph [0430]; claims; sequences	1-129
Y	WO 2004/058147 A (DELIATROPH PHARMACEUTICALS INC [US]; FROST GREGORY I [US]; KUNDU ANIRB) 15 July 2004 (2004-07-15) paragraph [0007]; claims	1-129
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2009

Date of mailing of the international search report

16/11/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Langer, Astrid

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/002352

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JIANG PING ET AL: "Effects of recombinant human PH20 (rHuPH20) on interstitial matrices: creating a favorable environment for the delivery of cytostatic agents." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 46, April 2005 (2005-04), page 1198, XP001525054</p> <p>& 96TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; ANAHEIM, CA, USA; APRIL 16 -20, 2005 ISSN: 0197-016X abstract</p>	1-129
A	<p>STERN R: "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?" GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 13, no. 12, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 105R-115R, XP003020022 ISSN: 0959-6658 Abstract page 111R, column 1, paragraph 3 - page 112R, column 1, paragraph 3</p>	1-129
A	<p>HELDIN P: "Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation" BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH, RIBEIRAO PRETO, BR, vol. 36, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 967-973, XP003020021 ISSN: 0100-879X the whole document</p>	
A	<p>MENZEL E J ET AL: "HYALURONIDASE AND ITS SUBSTRATE HYALURONAN: BIOCHEMISTRY, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND THERAPEUTIC USES" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 131, no. 1, 11 September 1998 (1998-09-11), pages 3-11, XP001008080 ISSN: 0304-3835 the whole document</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/002352

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>KADHIM SALAM A ET AL: "Antitumor activity of PEGylated recombinant human hyaluronidase (PEGPH20) in xenograft and syngeneic rat MatLyLu prostate carcinoma models"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 50, April 2009 (2009-04), page 64, XP001525055</p> <p>& 100TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; DENVER, CA, USA; APRIL 18 -22, 2009</p> <p>ISSN: 0197-016X</p> <p>abstract</p>	1-129
T	<p>JIANG PING ET AL: "PEGPH20: PEGylated recombinant human hyaluronidase antitumor activity in the 4T1 orthotopic breast carcinoma model"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 50, April 2009 (2009-04), page 65, XP001525053</p> <p>& 100TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; DENVER, CA, USA; APRIL 18 -22, 2009</p> <p>ISSN: 0197-016X</p> <p>abstract</p>	1-129

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/002352

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006091871 A	31-08-2006	AU 2006216545 A1	31-08-2006
		CA 2598823 A1	31-08-2006
		CN 101163717 A	16-04-2008
		EA 200701791 A1	28-02-2008
		EP 1858926 A1	28-11-2007
		JP 2008531017 T	14-08-2008
		KR 20080004473 A	09-01-2008
WO 2004058147 A	15-07-2004	AU 2003297199 A1	22-07-2004
		CA 2508948 A1	15-07-2004
		EP 1636248 A2	22-03-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	7/10	(2006.01)	A 6 1 P 7/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
C 1 2 N	9/26	(2006.01)	C 1 2 N 9/26

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 グレゴリー・アイ・フロスト

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、メルカド・ドライブ 1 3 6 6 2 番

(72)発明者 ピン・ジアン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 8 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー 1、ワールド・トレード・ドライブ 1 2 0 2 5 番

(72)発明者 カーティス・ビー・トンプソン

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州エンシニタス、イースト・エフ・ストリート 2 9 番

F ターム (参考) 4B050 CC02 CC03 DD07 GG03 LL01

4C076 AA01 AA06 AA09 AA12 AA17 AA19 AA22 AA24 AA30 AA31

AA36 AA53 AA72 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB24

BB27 BB29 BB31 CC14 CC27 DD23 DD60 EE23 EE59 FF63

4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA08 BA22 DC22 MA02 MA13 MA17

MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA32 MA35 MA36 MA37 MA41

MA43 MA44 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA60 MA63 MA66

NA03 NA05 ZA51 ZB26 ZC02