

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5670913号
(P5670913)

(45) 発行日 平成27年2月18日 (2015. 2. 18)

(24) 登録日 平成26年12月26日 (2014. 12. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 9/26 (2006. 01)	C 1 2 N 9/26 Z
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 38/46 (2006. 01)	A 6 1 K 37/54

請求項の数 27 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-540704 (P2011-540704)	(73) 特許権者	509136415
(86) (22) 出願日	平成21年12月9日 (2009. 12. 9)		ハロザイム インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-511327 (P2012-511327A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(43) 公表日	平成24年5月24日 (2012. 5. 24)		ディエゴ ソレント バレー ロード
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/006501		1 1 3 8 8
(87) 国際公開番号	W02010/077297	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成22年7月8日 (2010. 7. 8)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成23年10月28日 (2011. 10. 28)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	61/281, 240		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成21年11月13日 (2009. 11. 13)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 富田 憲史
(31) 優先権主張番号	61/201, 384	(74) 代理人	100144923
(32) 優先日	平成20年12月9日 (2008. 12. 9)		弁理士 中川 将之
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100156111
			弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 延長された可溶性PH20ポリペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：107のアミノ酸36-469、36-470または36-471として記載されているアミノ酸配列からなるポリペプチド；および

配列番号：107のアミノ酸36-469、36-470または36-471として記載されているアミノ酸配列においてアミノ酸置換を含むポリペプチド、ここで、該アミノ酸置換ポリペプチドは、配列番号：107のアミノ酸36-469、36-470または36-471として記載されているアミノ酸の対応する配列と、少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、ここで、該ポリペプチドは、可溶性であり、中性pHで配列番号：107のアミノ酸36-469、36-470または36-471として記載されているアミノ酸配列からなるポリペプチドの1つのヒアルロニダーゼ活性を維持しているから選択される短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項2】

配列番号：107のアミノ酸36-469、36-470または36-471として記載されているアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項3】

N-グリコシル化されている、請求項1または請求項2に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 4】

少なくとも3つのアスパラギン(N)残基のそれぞれに連結したN-アセチルグルコサミン部分を含む、請求項1から3のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 5】

3つのアスパラギン残基が、配列番号：107のアミノ酸残基235、368および393である、請求項4に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 6】

シアル化、アルブミン化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化およびリン酸化から選択される修飾により修飾されている、請求項1から5のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

10

【請求項 7】

ポリマーにより修飾されている、請求項1から5のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 8】

ポリマーがデキストランまたはPEGである、請求項7に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 9】

ポリペプチドをビフコシル化しない宿主細胞における発現により生産される、請求項1から8のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

20

【請求項 10】

宿主細胞が、哺乳動物宿主細胞または哺乳動物化昆虫細胞発現系である、請求項9に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 11】

ビフコシル化されていない、請求項1から8のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 12】

実質的に精製された、または単離された、請求項1から11のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチド。

【請求項 13】

請求項1から12のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドを含む複合体。

30

【請求項 14】

短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドが、多重体化ドメイン、毒素、検出可能な標識または薬物から選択される部分に複合体化している、請求項13に記載の複合体。

【請求項 15】

短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドがFcドメインに複合体化している、請求項14に記載の複合体。

【請求項 16】

請求項1または請求項2に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドをコードする核酸分子であって、全長PH20ヒアルロニダーゼをコードしないが、短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドをコードする核酸分子。

40

【請求項 17】

請求項1または請求項2に記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドを発現するための、該短縮されたPH20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配列からなるポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 18】

請求項17に記載のベクターまたは請求項16に記載の核酸分子を含む細胞。

【請求項 19】

50

CHO細胞である、請求項18に記載の細胞。

【請求項20】

請求項1から12のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドを含む組成物。

【請求項21】

医薬組成物である、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

さらなる治療剤を含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

治療剤が、化学療法剤、鎮痛剤、抗炎症剤、抗菌剤、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、鎮痙剤、抗抑制薬、抗関節炎剤、抗真菌剤、抗高血圧剤、解熱剤、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン剤、アルファアドレナリン作動薬、アルファ遮断薬、麻酔薬、気管支拡張剤、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、ベータアドレナリン遮断薬、カルシウムチャンネル遮断薬、心血管作動薬、避妊薬、充血除去剤、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質物質、催眠剤、ホルモン剤、血糖上昇剤、筋弛緩剤、筋肉収縮剤、眼科用剤、副交感神経作用薬、精神賦活剤、鎮静剤、交感神経様作用薬、精神安定剤、尿路剤、膣剤、殺ウイルス剤、ビタミン剤、非ステロイド系抗炎症剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ポリペプチド、タンパク質、核酸、薬物、有機分子、睡眠導入剤、抗体、免疫グロブリン、ビスホスホネート、サイトカイン、化学療法剤およびインスリンから選択される、請求項22に記載の組成物。

10

20

【請求項24】

ヒアルロナン関連疾患または状態を処置するための、グリコサミノグリカン過剰を処置するための、腫瘍を処置するための、脳におけるグリコサミノグリカン蓄積を処置するための、心疾患を処置するための、眼科疾患を処置するための、肺疾患を処置するための、固形腫瘍への化学療法剤の浸透を増加させるための、セルライトを処置するための、増殖性疾患を処置するための、または薬物および他の治療剤のバイオアベイラビリティを増加させるための医薬の製造における、請求項1から12のいずれかに記載の短縮されたPH20ヒアルロニダーゼポリペプチドまたは請求項20から23のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項25】

ヒアルロナン関連疾患または状態を処置するための、グリコサミノグリカン過剰を処置するための、腫瘍を処置するための、脳におけるグリコサミノグリカン蓄積を処置するための、心疾患を処置するための、眼科疾患を処置するための、肺疾患を処置するための、固形腫瘍への化学療法剤の浸透を増加させるための、セルライトを処置するための、増殖性疾患を処置するための、または薬物および他の治療剤のバイオアベイラビリティを増加させるための、請求項20から23のいずれかに記載の医薬組成物。

30

【請求項26】

増殖性疾患が良性前立腺過形成である、請求項24に記載の使用。

【請求項27】

増殖性疾患が良性前立腺過形成である、請求項25に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

2009年11月13日に出願された「EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF,」と題されたGe Wei、Krishnasamy Panneerselvam、Louis BookbinderおよびGregory I. Frostの米国仮出願番号第61/281,240号、および2008年12月9日に出願された「EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF,」と題されたGe Wei、Krishnasamy Panneerselvam、Louis BookbinderおよびGregory I. Frostの米国仮出願番号第61/201,384号の優先権の利益を主張する。許されるとき、上記

50

関連出願の主題は、その全体において出典明示により包含させる。

【 0 0 0 2 】

本出願は、米国仮出願番号第 6 1 / 2 8 1 , 2 4 0 および 6 1 / 2 0 1 , 3 8 4 号の優先権を主張する「EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF,」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 1 2 / 6 5 3 , 2 4 5 号に関連する。

【 0 0 0 3 】

許されるとき、上記関連出願の主題は、その全体において出典明示により包含させる。

【 0 0 0 4 】

発明の分野

可溶性 P H 2 0 ポリペプチド、例えば、延長された可溶性 P H 2 0 ポリペプチドおよびそれらの使用を提供する。また、他の C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドおよび部分的に脱グリコシル化された P H 2 0 ポリペプチドならびにそれらの使用も提供する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 5 】

背景

ヒアルロナン(ヒアルロン酸; H A)は、多数の細胞の細胞外マトリックス、とりわけ軟結合組織において見出されるポリペプチドである。H A は、また、哺乳動物における皮膚、軟骨および滑液において主に見られる。ヒアルロナンは、また、眼の硝子体の主成分である。H A は、種々の生理学的プロセス、例えば、水および血漿タンパク質ホメオスタシス中で役割を有する(Laurent TC 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/または生産と関連する。ヒアルロニダーゼは、ヒアルロナンを分解する酵素である。H A を触媒することにより、ヒアルロニダーゼは、H A または他のグリコサミノグリカンの蓄積と関連する疾患または障害を処置するために使用することができる。また、H A が間質バリアの主成分であるため、ヒアルロニダーゼは組織透過性を増加させ、したがって治療剤の分散および送達を増加させるために使用することができる。種々のヒアルロニダーゼは、一般的に分散剤および展着剤として、他の治療剤と組み合わせて、治療的に使用されている(例えば、HydaseTM、VitraseTMおよびWydaseTM)。これらの多くは、ヒトの処置に対して免疫原性であり得るヒツジまたはウシ形態である。処置のために使用することができるヒアルロニダーゼの改善された組成物が必要である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

要約

本明細書において提供されるものは、可溶性 P H 2 0 ポリペプチド、例えば、延長された可溶性 P H 2 0 (e s P H 2 0) ポリペプチドおよび組成物である。本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチドは、C - 末端で短縮されている可溶性タンパク質であり、G P I アンカー結合シグナル配列の全てを欠いている(例えば、アミノ酸位置 4 5 0 から 4 9 0 で短縮されている)ものを含む。可溶性 P H 2 0 ポリペプチドは、また、対応する全長野生型 P H 2 0 ポリペプチドの G P I アンカー結合シグナル配列に位置する 1 個以上の残基を維持する延長された可溶性 P H 2 0 ポリペプチドを含む。また、本明細書において提供されるものは、C - 末端切断を含む他の修飾された P H 2 0 ポリペプチドである。あらゆるポリペプチドの部分的に脱グリコシル化された形態も提供される。また、提供されるものは、本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチドを使用する処置方法である。

【 0 0 0 7 】

本明細書において提供されるものは、N - グリコシル化または部分的に N - グリコシル化されていてもよい単離され実質的に精製された延長された可溶性 P H 2 0 (e s P H 2 0) ヒアルロニダーゼである。いくつかの例において、部分的に N - グリコシル化された e s P H 2 0 ポリペプチドは、例えば、配列番号: 1 0 7 のアミノ酸残基 3 6 8 および 3 9 3、または配列番号: 1 0 7 のアミノ酸残基 3 6 8 および 3 9 3 に対応する残基のよう

10

20

30

40

50

な、少なくとも2つのN-連結部分のそれぞれに連結した少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。いくつかの局面において、部分的にN-グリコシル化されたe s P H 2 0ポリペプチドは、少なくとも2つのN-連結部分のそれぞれに連結した少なくとも2つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。本明細書において提供される部分的にN-グリコシル化されたe s P H 2 0ポリペプチドは、また、分岐糖を含むことができる。

【0008】

本明細書において提供されるものは、配列番号：60-63および102-104のいずれかに記載されているアミノ酸配列を有するe s P H 2 0ポリペプチドまたはそれらの対立遺伝子もしくは種変異体である。また、提供されるものは、配列番号：60-63および102-104のいずれかと少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%配列同一性を有し、対応する修飾されていない形態の、または配列番号：107のアミノ酸36-482を有するポリペプチドをコードする核酸によってコードされるポリペプチドのヒアルロニダーゼ活性の少なくとも30%を維持しているe s P H 2 0ポリペプチド変異体である。このようなe s P H 2 0ポリペプチドは、可溶性および中性活性を維持する。1つの例において、e s P H 2 0は、ヒトe s P H 2 0、例えば、配列番号：60-63および102-104のいずれかに記載されているアミノ酸の配列を有するもの、またはチンパンジーe s P H 2 0、例えば、配列番号：197のアミノ酸36-491、36-492、36-493、36-494、36-495、36-496、36-497または36-498として記載されているアミノ酸配列を有するものである。

【0009】

また、本明細書において提供されるものは、実質的に精製されたP H 2 0ポリペプチドである。これらのP H 2 0ポリペプチドは、配列番号：55-63および64-95のいずれかに記載されているアミノ酸配列またはそれらの対立遺伝子もしくは種変異体を有し得る。他の例において、P H 2 0ポリペプチドは、対応する修飾されていない形態の、または配列番号：107のアミノ酸36-482を有するポリペプチドをコードする核酸によってコードされるポリペプチドのヒアルロニダーゼ活性の少なくとも30%を維持している、配列番号：55-63および64-95のいずれかと少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する変異体である。このようなP H 2 0ポリペプチドは中性活性である。

【0010】

本明細書において提供されるP H 2 0ポリペプチドは、N-グリコシル化または部分的にN-グリコシル化され得る。いくつかの例において、部分的にN-グリコシル化されたe s P H 2 0ポリペプチドは、例えば、配列番号：107のアミノ酸残基368および393、または配列番号：107のアミノ酸残基368および393に対応する残基のような、少なくとも2つのN-連結部分のそれぞれに連結した少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。いくつかの局面において、部分的にN-グリコシル化されたP H 2 0ポリペプチドは、少なくとも2つのN-連結部分のそれぞれに連結した少なくとも2つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。本明細書において提供される部分的にN-グリコシル化されているP H 2 0ポリペプチドは、また、分岐糖を含むことができる。いくつかの局面において、本明細書において提供されるP H 2 0ポリペプチドは可溶性であり、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザル、マウス、ウサギ、モルモット、ウシまたはヒツジP H 2 0から選択することができる。

【0011】

本明細書において提供されるe s P H 2 0およびP H 2 0ポリペプチドは、例えば、シアル化、アルブミン化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化またはリン酸化により修飾され得る。いくつかの局面において、e s P H 2 0およびP H 2 0ポリペ

10

20

30

40

50

チドは、ポリマー、例えば、デキストランまたはPEGにより修飾される。また、本明細書において提供されるものは、e s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドを含む複合体である。典型的な複合体は、e s P H 2 0またはP H 2 0が多重体化ドメイン(例えば、Fcドメイン)、毒素、検出可能な標識または薬物と複合体化しているものを含む。

【0012】

本明細書において提供されるものは、上記の、および本明細書において提供されるe s P H 2 0およびP H 2 0ポリペプチドをコードする核酸である。これらの核酸は、配列番号：107のアミノ酸36-450、36-451、36-452、36-453、36-454、36-455、36-456、36-457、36-458、36-459、36-460、36-461、36-462、36-463、36-464、36-465、36-484、36-485、36-486、36-487、36-489、36-491、36-492、36-493、36-494、36-495、36-496または36-497に対応するアミノ酸を有するe s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドをコードするもの、および配列番号：197のアミノ酸36-491、36-492、36-493、36-494、36-495、36-496、36-497または36-498に対応するアミノ酸を有するe s P H 2 0をコードするものを含む。また、本明細書において提供されるものは、これらの核酸を含むベクターおよび該ベクターを含む細胞、例えば、CHO細胞である。

【0013】

本明細書において提供されるものは、本明細書に記載されている任意の1つ以上のe s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドを含む組成物である。いくつかの例において、組成物は、複数のe s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドを含む。例えば、組成物は、配列番号：107のアミノ酸36-450、36-451、36-452、36-453、36-454、36-455、36-456、36-457、36-458、36-459、36-460、36-461、36-462、36-463、36-464、36-465、36-484、36-485、36-486、36-487、36-489、36-491、36-492、36-493、36-494、36-495、36-496または36-497に対応するアミノ酸をコードする核酸分子によってコードされる複数のe s P H 2 0ポリペプチド、および配列番号：197のアミノ酸36-491、36-492、36-493、36-494、36-495、36-496、36-497または36-498に対応するアミノ酸を有するe s P H 2 0をコードするものを含むことができる。いくつかの例において、組成物は、CHO細胞から分泌されるe s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドを含む。

【0014】

本明細書において提供される組成物は医薬組成物であり得る。いくつかの例において、組成物は、組成物と共に、または別々の組成物において製剤化することができる、さらなる治療剤を含む。本明細書において提供される組成物に含むことができる典型的な治療剤は、化学療法剤、鎮痛剤、抗炎症剤、抗菌剤、殺アメーバ剤、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、鎮痙剤、抗抑制薬、抗関節炎剤、抗真菌剤、抗高血圧剤、解熱剤、抗寄生虫薬、抗ヒスタミン剤、アルファアドレナリン作動性アゴニスト剤、アルファ遮断薬、麻酔薬、気管支拡張剤、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、ベータアドレナリン遮断薬、カルシウムチャンネル遮断薬、心血管作動薬、避妊薬、充血除去剤、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質物質、催眠剤、ホルモン剤、血糖上昇剤、筋弛緩剤、筋肉収縮剤、眼科用剤、副交感神経作用薬、精神賦活剤、鎮静剤、交感神経様作用薬、精神安定剤、尿路剤、膾剤、殺ウイルス剤、ビタミン剤、非ステロイド系抗炎症剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ポリペプチド、タンパク質、核酸、薬物、有機分子および睡眠導入剤である。特定の例において、治療剤は、抗体、免疫グロブリン、ピスホスホネート(例えば、ゾレドロン酸(zolentronic acid))、サイトカイン、化学療法剤またはインスリン(例えば、即効性インスリン)である。

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書において提供される組成物に含むことができる他の治療剤は、アスピリン、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-シス-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、三酸化ヒ素、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、BCG Live、ベナキシピン、ベンダムスチン、ベンゾ
デパ、ベキサロテン、ベパシズマブ、ピカルタミド、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、カベシタピン、カラセミド、カルベチマー、カルボブラ
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、クラドリピン、クランフェヌル
、クロファラピン、クリスナトール、シクロホスファミド、リボゾーマルシタラピン、シ
タラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、リボゾーマルダ
ウノルピシン、ダウノルピシン/ダウノマイシン、ダウノルピシン、デシタピン、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、デクスラゾキサソ、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、リボゾーマルドキソルピシン、ドキシソ
ルピシンHCL、ドコルピシンHCLリボソーム注射剤、ドキシソルピシン、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、エピルピシン、エポエチンアルファ、エプタロプロスト、エルプロゾ
ール、エソルピシン、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VP-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、ファザラピン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フロクスウリ
ジン、フルダラピン、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
、フルロシタピン、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、ガラルピシン、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、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ/チウキセタン、イダルピシン、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、インターフェロンアルファ-2a、インター
フェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インタ
ーフェロンガンマ、インターフェロン、インターロイキン-2s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
CNU、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

10

20

30

40

50

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、ミゾルピン、モファロテン、モビダモール、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、ネモルピシン、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-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、テモポルフィン、テモゾロマイド、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、バルルピシン、バルスポダル、バプレオチド、ベルテポルフィン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピネピジン、ピンフルニン、ピンホルミド、ピングリシネート、ピンロイシノール、ピンロイロシン、ピノレルピン、ピンロシジン、ピントリプトール、ピンゾリジン、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を含むが、これらに限定されない。

【0016】

本明細書において提供されるものは、ヒアルロナン関連疾患または状態を処置するための方法であって、対象が本明細書に提供されている、および記載されているe s P H 2 0もしくはP H 2 0、またはe s P H 2 0もしくはP H 2 0を含む組成物を投与される方法である。また、提供されるものは、グリコサミノグリカン過剰を処置するための；腫瘍を処置するための；脳におけるグリコサミノグリカン蓄積を処置するための；心疾患を処置するための；眼科疾患を処置するための；肺疾患を処置するための；固形腫瘍への化学療法剤の浸透を増加させるための；セルライトを処置するための；または薬剤および他の治療剤のバイオアベイラビリティを増加させるための方法である。このような方法は、本明細書に記載されているe s P H 2 0またはP H 2 0ポリペプチドまたは組成物のいずれかを対象に投与することを含む。

【0017】

本明細書において提供されるe s P H 2 0およびP H 2 0ポリペプチドは、P H 2 0ヒアルロニダーゼが米国公開番号第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号；ならびに米国出願第12/381,844、

10

20

30

40

50

12/386, 249、12/387、225および12/386、222号において使用される任意の処置方法または併用療法において、PH20ヒアルロニダーゼの代わりに、単独または組み合わせて使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、ヒト（配列番号：107）およびチンパンジー（配列番号：197）PH20ポリペプチドのアミノ酸配列のアラインメントを示す（ClustalW2アラインメントプログラムを使用して行った）。ヒトPH20 GPIアンカー結合シグナル配列のアミノ酸残基およびチンパンジーPH20配列における対応するアミノ酸は、太字で下線が引かれている。「*」は、上記残基がアラインメントにおいて両方の配列が同一であることを示す。「:」は保存された置換を示し、「.」は半保存された置換を示す。

10

【図2】図2は、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型グリカンを含む脊椎動物におけるN-グリカンの主な型を示す。

【図3】図3は、エンドグリコシダーゼ開裂部位を示す。図3Aは、エンドグリコシダーゼF1およびペプチドNグリコシダーゼF（PNGaseF）に対する開裂部位を説明する。図3Bは、エンドグリコシダーゼF2およびPNGaseFに対する開裂部位を説明する。図3Cは、エンドグリコシダーゼF3およびPNGaseFに対する開裂部位を説明する。図3Dは、エンドグリコシダーゼF4およびPNGaseFに対する開裂部位を説明する。

【発明を実施するための形態】

20

【0019】

詳細な説明

概観

A. 定義

B. 概観

1. PH20

a. グリコシル化

b. GPI固定

C. 延長された可溶性PH20ポリペプチド

1. ヒトesPH20ポリペプチド

2. 他の種のesPH20ポリペプチド

30

D. 部分的にN-グリコシル化されたPH20ポリペプチド

1. PH20ポリペプチド

2. C-末端を短縮されたPH20ポリペプチド

3. さらなる修飾

ポリマーへの結合

E. 延長された可溶性PH20および他の可溶性PH20ヒアルロニダーゼならびにそれらのポリペプチドをコードする核酸を生産する方法

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. 哺乳動物細胞

e. 植物

3. 精製技術

40

F. 延長された可溶性PH20ポリペプチドおよび他の可溶性PH20ポリペプチドの製造、製剤化および投与

1. 注射可能物質、溶液およびエマルジョン

凍結乾燥粉末

50

- 2. 局所投与
- 3. 他の投与経路のための組成物
- 4. 用量および投与
- 5. パッケージング、製品およびキット
- G. アッセイ
 - 1. ヒアルロニダーゼ活性
 - 2. 溶解度
- H. 延長された可溶性 P H 2 0 および他の可溶性 P H 2 0 の処置方法および使用ならびに併用療法
 - 1. 展着剤および併用療法としての使用 10
 - 2. 過剰のグリコサミノグリカナーゼを除去するための使用
 - a. 癌の処置における使用
 - b. 脳におけるグリコサミノグリカン蓄積の処置における使用
 - c. 心臓血管疾患におけるグリコサミノグリカン蓄積の処置における使用
 - d. 硝子体切除および眼科疾患および状態における使用
 - e. 皮下注入における使用
 - f. 遺伝子治療における使用
 - g. 化粧用途
 - h. 臓器移植における使用
 - i. 肺疾患における使用 20
 - 3. 他の使用
- I. 実施例
 - 【0020】
 - A. 定義

特に定義がない限り、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、本発明が属する当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書における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他の公開された資料は、他に記載のない限り、それらの全体を出典明示により包含させる。本明細書における用語に対して複数の定義が存在する場合、このセクションにおけるものが優先される。URL または他のこのような識別子もしくはアドレスが言及されるとき、このような識別子が変化し得、インターネット上の特定の情報が移り変わり得るが、同等の情報がインターネットを検索することにより見出すことができることが理解される。それらへの言及は、このような情報の有効性および公的普及を証明する。 30
 - 【0021】

本明細書において使用されるヒアルロニダーゼは、ヒアルロナンを分解する酵素の1クラスを示す。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 4.2.99.1)、ヒル、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) ならびに哺乳動物型ヒアルロニダーゼ (EC 3.2.1.35) を含むが、これらに限定されない。ヒアルロニダーゼは、あらゆる非ヒト起源のもの、例えば、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ、鳥類、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、魚類、カエル、細菌、および、ヒル、他の寄生生物および甲殻類を含むが、これらに限定されない。典型的なヒトヒアルロニダーゼは、HYAL 1、HYAL 2、HYAL 3、HYAL 4 および PH 2 0 (配列番号: 107) を含む。また、ヒアルロニダーゼの中に含まれるものは、可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、ヒツジおよびウシ PH 2 0、可溶性ヒト PH 2 0 および rHuPH 2 0 である。市販されているウシまたはヒツジの可溶性ヒアルロニダーゼの例は、Vitrase (登録商標) ヒアルロニダーゼ (ヒツジヒアルロニダーゼ) および Amphadase (登録商標) ヒアルロニダーゼ (ウシヒアルロニダーゼ) である。 40
 - 【0022】

本明細書において使用される PH 2 0 は、精子中で生じ、中性活性であるヒアルロニダ 50

ーゼの1つの型を示す。PH20は、精子表面上に、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。PH20は、あらゆる起源のもの、ヒト、チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、マウス、ウシ、ヒツジ、モルモット、ウサギおよびラット起源のものを含むが、これらに限定されない。典型的なPH20ポリペプチドは、ヒト（配列番号：107）、チンパンジー（配列番号：197）、アカゲザル（配列番号：198）、カニクイザル（配列番号：114）、ウシ（例えば、配列番号：111および119）；マウス（配列番号：117）；ラット（配列番号：116）；ウサギ（配列番号：112）；ヒツジ（配列番号：113、118および120）およびモルモット（配列番号：115）由来のものを含む。PH20への言及は、前駆体PH20ポリペプチドおよび成熟体PH20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）、10
 活性を有するそれらの短縮された形態を含み、対立遺伝子変異体および種変異体、スプライス変異体によってコードされる変異体および他の変異体、例えば、配列番号：107および109に記載されている前駆体ポリペプチドまたはそれらの成熟形態と少なくとも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を含む。PH20ポリペプチドは、また、化学または翻訳後修飾を含むものおよび化学または翻訳後修飾を含まないものを含む。このような修飾は、ベグ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化および当該分野で知られている他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。短縮されたPH20ヒアルロニダーゼは、それらのC-末端を短縮されたあらゆる形態、特にN-グリ20
 コシル化のとき短縮され、中性活性である形態である。

【0023】

本明細書において使用される可溶性PH20は、生理学的条件下で可溶性であるPH20のあらゆる形態を示す。可溶性PH20は、例えば、37でTriton（登録商標）X-114溶液の水相への分配により同定することができる（Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7）。膜に固定されたPH20、例えば、脂質に固定されたPH20、例えば、GPIに固定されたPH20は、界面活性剤リッチな相に分配するが、ホスホリパーゼCで処理後は、界面活性剤の乏しい相または水相に分配する。可溶性PH20の中に含まれるものは、PH20の膜との固定と関連する1つまたはそれ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維持している、膜に30
 固定されたPH20である。可溶性PH20は、また、組換え可溶性PH20および、例えば、ヒツジまたはウシに由来する精巢抽出物のような天然供給源に含まれるもの、または該供給源中から精製されたものを含む。典型的なこのような可溶性PH20は、可溶性ヒトPH20である。

【0024】

本明細書において使用される可溶性ヒトPH20またはsHuPH20は、発現時に生理学的条件下で可溶性であるように、C-末端のグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー配列のすべてまたは一部を欠いているPH20ポリペプチドを含む。溶解度は、生理学的条件下での溶解度を証明する任意の適当な方法により評価することができる。典型的なこのような方法は、上記の、および実施例に記載されている水相への分配を評価するTriton（登録商標）X-114アッセイである。加えて、可溶性ヒトPH20ポリペプチドは、CHO細胞、例えば、CHO-S細胞において生産されるとき、40
 発現され、細胞培養培地に分泌されるポリペプチドである。しかしながら、可溶性ヒトPH20ポリペプチドは、CHO細胞において生産されるものに限定されず、任意の細胞において、または組換え発現およびポリペプチド合成を含む任意の方法により生産することができる。CHO細胞における分泌への言及において定義される。したがって、ポリペプチドがCHO細胞において発現され、分泌され、そして可溶性である、すなわち、Triton（登録商標）X-114で抽出されるとき水相に分配されるとき、それは、実際そのように生産されるか否かにかかわらず可溶性PH20ポリペプチドである。sHuPH20ポリペプチドに対する前駆体ポリペプチドは、シグナル配列、例えば、異種または50

非異種（すなわち天然）シグナル配列を含むことができる。典型的な前駆体は、シグナル配列、例えば、アミノ酸位置 1 - 35 の天然の 35 個のアミノ酸シグナル配列（例えば、配列番号：107 のアミノ酸 1 - 35 参照）を含むものである。

【0025】

本明細書において使用される「延長された可溶性 PH20」または「esPH20」は、esPH20 が生理学的条件下で可溶性であるように、GPI アンカー結合シグナル配列までの残基および GPI アンカー結合シグナル配列から 1 個以上の隣接する残基を含む可溶性 PH20 ポリペプチドを含む。生理学的条件下での溶解度は、当業者に知られている任意の方法により測定することができる。例えば、それは、上記の、および実施例の Triton（登録商標）X-114 アッセイにより評価することができる。加えて、上記のとおり、可溶性 PH20 は、CHO 細胞、例えば、CHO-S 細胞において生産される時、発現され、細胞培養培地に分泌されるポリペプチドである。しかしながら、可溶性ヒト PH20 ポリペプチドは、CHO 細胞において生産されるものに限定されず、任意の細胞において、または組換え発現およびポリペプチド合成を含む任意の方法により生産することができる。CHO 細胞における分泌への言及において定義される。したがって、ポリペプチドが CHO 細胞において発現され、分泌され、そして可溶性である、すなわち、Triton（登録商標）X-114 で抽出されるとき水相に分配されるとき、それは、そのように生産されるか否かにかかわらず可溶性 PH20 ポリペプチドである。ヒト可溶性 esPH20 ポリペプチドは、得られるポリペプチドが可溶性であるように、残基 36 - 490 に加えて、配列番号：107 のアミノ酸残基位置 491（含む）から 1 個以上の隣接するアミノ酸を含む。典型的なヒト esPH20 可溶性ポリペプチドは、配列番号：107 のアミノ酸 36 - 491、36 - 492、36 - 493、36 - 494、36 - 495、36 - 496 および 36 - 497 に対応するアミノ酸残基を有するものである。典型的なこれらのものは、配列番号：60 - 63 および 102 - 104 のいずれかに記載されているアミノ酸配列を有するものである。また、含まれるものは、天然の活性を維持し、可溶性である、対立遺伝子変異体および他の変異体、例えば、配列番号：60 - 63 および 102 - 104 の対応するポリペプチドと 40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、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するあらゆるものである。配列同一性への言及は、アミノ酸置換を有する変異体を示す。

【0026】

本明細書において使用される esPH20 への言及は、前駆体 esPH20 ポリペプチドおよび成熟体 esPH20 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）、酵素活性を有し、可溶性であるそれらの短縮された形態（全長形態の少なくとも 1%、10%、20%、30%、40%、50% またはそれ以上を維持している）を含み、対立遺伝子変異体および種変異体、スプライス変異体によってコードされる変異体、および他の変異体、例えば、配列番号：107 および 109 に記載されている前駆体ポリペプチドまたはそれらの成熟形態と少なくとも 40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、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するポリペプチドを含む。

【0027】

本明細書において使用される esPH20 への言及は、また、化学または翻訳後修飾を含むもの、および化学または翻訳後修飾を含まないものを含む。このような修飾は、ペグ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、および当該分野で知られている他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。

【0028】

本明細書において使用される可溶性組換えヒト PH20（rHuPH20）は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において組換式的に発現され、分泌されるヒト PH20 の可溶性形態を示す。可溶性 rHuPH20 は、シグナル配列を含む核酸によってコ

10

20

30

40

50

ードされ、配列番号：109に記載されている。また、含まれるものは、その対立遺伝子変異体および他の可溶性変異体であるDNA分子である。可溶性rHuPH20をコードする核酸は、成熟体ポリペプチドを分泌するCHO細胞において発現される。培養培地で生産されるとき、生成物が種々の量で配列番号：122から配列番号：127のうち1種以上を含み得る種の混合物を含むようにC末端で不均一性である。

【0029】

同様に、PH20の他の形態、例えば、esPH20について、組換え的に発現されるポリペプチドおよびそれらの組成物は、C-末端が不均一性を示す複数の種を含むことができる。例えば、アミノ酸36-497を有するesPH20をコードする、配列番号：8のポリペプチドの発現により生産される組換え的に発現されるesPH20の組成物は、より少ないアミノ酸、例えば、36-496、36-495を有する形態を含むことができる。

10

【0030】

本明細書において使用されるN-連結部分は、ポリペプチドの翻訳後修飾によりグリコシル化される可能性があるポリペプチドのアスパラギン(N)アミノ酸残基を示す。典型的なヒトPH20のN-連結部分は、配列番号：107に記載されているヒトPH20のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393を含む。

【0031】

本明細書において使用されるN-グリコシル化されたポリペプチドは、少なくとも3つのN-連結アミノ酸残基、例えば、配列番号：107のアミノ酸残基N235、N368およびN393に対応するN-連結部分のオリゴ糖連結を含むPH20ポリペプチドまたはその短縮された形態を示す。N-グリコシル化されたポリペプチドは、3、4、5およびすべてのN-連結部分がオリゴ糖に連結しているポリペプチドを含むことができる。N-連結オリゴ糖は、オリゴマンノース、複合型、ハイブリッドまたは硫酸化オリゴ糖、または他のオリゴ糖および単糖類を含むことができる。

20

【0032】

本明細書において使用される部分的にN-グリコシル化されたポリペプチドは、少なくとも3つのN-連結部分に連結したN-アセチルグルコサミングリカンを含むポリペプチドを示す。部分的にグリコシル化されたポリペプチドは、種々のグリカン形態、例えば、単糖類、オリゴ糖および分岐糖形態、例えば、EndoH、EndoF1、EndoF2および/またはEndoF3でのポリペプチドの処理により形成されるものを含むことができる。このような酵素によるグリカンの開裂は、例えば、図2に記載されている。

30

【0033】

本明細書において使用される脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドは、すべてよりも少ない可能なグリコシル化部位がグリコシル化されている、本明細書において提供されるPH20ポリペプチドを示す。脱グリコシル化は、例えば、グリコシル化を除去することにより、それを防止することにより、またはグリコシル化部位を除去するようにポリペプチドを修飾することによりもたすことができる。本明細書において示されているように、特定のN-グリコシル化部位は活性のために必要ではないが、必要なものもある。

40

【0034】

本明細書において使用されるヒアルロナン関連疾患、障害または状態は、ヒアルロナンレベルが、疾患または状態における原因、結果または観察されるその他のことで上昇するあらゆる疾患または状態を示す。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、間質液圧の増加、血管容量の減少、および/または組織における水分含有量の増加と関連する。ヒアルロナン関連疾患、障害または状態は、ヒアルロナン分解酵素、例えば、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼを含む組成物を単独または別の処置および/または薬物と組み合わせるの、もしくは加えての投与により処置することができる。典型的な疾患および状態は、限定はしないが、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、末期癌、転移性癌、未分化

50

癌、卵巣癌、in situ癌腫 (ISC)、扁平上皮癌腫 (SCC)、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞性肺癌、乳癌、大腸癌および他の癌を含む。また、典型的なヒアルロナン関連疾患および状態は、間質液圧の上昇と関連する疾患、例えば、椎間板圧迫と関連する疾患、および浮腫、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷または他の損傷により引き起こされる浮腫である。典型的なヒアルロナン関連疾患および状態は、間質液圧の上昇、血管容量の減少、および/または組織における水分含有量の増加と関連する疾患および状態、例えば、癌、椎間板圧迫および浮腫を含む。1つの例において、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の処置は、1つ以上の間質液圧 (IFP) の増加、血管容量の減少および組織における水分含有量の増加における改善、減少または他の有益な効果を含む。

【0035】

本明細書において使用される複合体は、1つ以上の他のポリペプチドまたは化学部分と直接的または間接的に連結している可溶性PH20ポリペプチドを示す。このような複合体は、融合タンパク質、化学複合体により生産されるもの、および任意の他の方法により生産されるもの(少なくとも1つの可溶性PH20ポリペプチドは、複合体がヒアルロニダーゼ活性を維持する限り、別のポリペプチドまたは化学部分と直接的または間接的に連結している)を含む。典型的な本明細書において提供される複合体は、多重体化ドメイン、例えば、Fc部分、毒素、標識または薬物(drug)と直接的または間接的に連結しているPH20ポリペプチドを含む。

【0036】

本明細書において使用される融合タンパク質は、一方の核酸分子由来のコード配列およびもう一方の核酸分子由来のコード配列を含む核酸配列によってコードされるポリペプチドを示す(融合構築物が宿主細胞において転写され、翻訳されるとき、タンパク質が2つのタンパク質を含むように生産されるようにコード配列は同じリーディングフレームにある)。2つの分子は、構築物中で近接していてもよく、また1、2、3個またはそれ以上であるが、一般的に10、9、8、7または6個より少ないアミノ酸を含むリンカーポリペプチドにより分離されていてもよい。融合構築物によってコードされるタンパク質産物は、融合ポリペプチドとして示される。典型的な融合ポリペプチドは、Fc融合を含む。

【0037】

本明細書において使用されるヒアルロナン分解酵素、例えば、ヒアルロニダーゼと複合体化しているポリマーは、ヒアルロナン分解酵素に直接的にまたはリンカーを介して共有結合されているか、または別の方法で安定に連結されているあらゆるポリマーを示す。このようなポリマーは、一般的に、血清半減期を増大し、シアル部分、ペグ化部分、デキストラン、ならびに、例えば、グリコシル化のための糖および他の部分を含むが、これらに限定されない。

【0038】

本明細書において使用される活性は、全長(完全)タンパク質と関連するポリペプチドまたはその一部の機能活性を示す。機能活性は、生物学的活性、触媒または酵素活性、抗原性(抗ポリペプチド抗体への結合に対するポリペプチドと結合または競合する能力)、免疫原性、多量体を形成する能力およびポリペプチドに対する受容体またはリガンドに特異的に結合する能力を含むが、これらに限定されない。

【0039】

本明細書において使用されるヒアルロニダーゼ活性は、ヒアルロン酸の開裂を酵素的に触媒する能力を示す。ヒアルロニダーゼに対する米国薬局方(USP)XXIIアッセイは、高分子量ヒアルロン酸またはヒアルロナン(HA)と37で30分間反応させた後に残存するHA基質の量を測定することにより間接的にヒアルロニダーゼ活性を測定する(USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, MD)。参照標準溶液は、任意のヒアルロニダーゼの単位における相対活性を確認するためのアッセイにおいて使用することができる。ヒアルロニダーゼ、例えば、PH20、例えば、可溶性PH20およびesPH20のヒアルロニダーゼ活性を測定するためのインビトロアッセイは、当該分野で知られており、本明細書に記載されている。典型

10

20

30

40

50

的なアッセイは、開裂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ときに形成される不溶性沈殿を検出することにより、間接的にヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸の開裂を測定する、以下に記載されているマイクロ濁度(microturbidity)アッセイ(例えば、実施例12参照)を含む。参照標準は、試験されるヒアルロニダーゼの単位における活性を決定するために、例えば、標準曲線を作成するために、使用することができる。

【0040】

本明細書において使用される中性活性は、PH20ポリペプチドが中性pHでヒアルロン酸の開裂を酵素的に触媒する能力を示す。本明細書において提供される中性活性であるC-末端で短縮されている、または部分的にN-グリコシル化されているPH20は、C-末端で短縮されていないか、または部分的にN-グリコシル化されていない対応する中性活性であるPH20のヒアルロニダーゼ活性と比較して、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、300%、400%、500%、1000%またはそれ以上の活性を有する。

10

【0041】

本明細書において使用されるGPIアンカー結合シグナル配列は、ERの内腔内でポリペプチドにあらかじめ形成されたGPIアンカーの付加を指向するC-末端アミノ酸配列である。GPIアンカー結合シグナル配列は、GPIに固定されたポリペプチド、例えば、GPIに固定されたPH20ポリペプチドの前駆体ポリペプチドに存在する。C-末端GPIアンカー結合シグナル配列は、一般的に、-部位またはGPIアンカー結合部位のすぐ下流の8-12個のアミノ酸の親水性スパーサー領域の前に、主に8-20個のアミノ酸の疎水性領域を含む。GPIアンカー結合シグナル配列は、当該分野でよく知られている方法を使用して同定することができる。これらは、コンピューターによる方法およびアルゴリズム(例えば、Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582, Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:741-758, Kronegg and Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 10例えば、ウェブサイト129.194.185.165/dgpi/, Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392参照)、例えば、バイオインフォマティクスウェブサイトの、例えば、EXPASY Proteomics ツールサイト(例えば、World Wide Web サイトexpasy.ch/tools/)で容易に利用できるものを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0042】

本明細書において使用されるビフコシル化(bifucosylate)されたポリペプチドは、ポリペプチド鎖におけるアスパラギン残基に連結しているN-アセチルグルコサミン部分で、同じ核のN-アセチルグルコサミン部分に連結している2つのフコース残基(一方が1,3-連結およびもう一方が1,6-連結)を有するポリペプチドを示す。ビフコシル化されたポリペプチドは、一般的に昆虫細胞において生産される。

【0043】

本明細書において使用される核酸は、DNA、RNAおよびそれらの類似体、例えば、ペプチド核酸(PNA)およびそれらの混合物を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。例えば、検出可能な標識、例えば、蛍光または放射性標識で所望により標識されたプローブまたはプライマーに言及するとき、一本鎖分子が考えられる。このような分子は、一般的に、標的が統計的に独特であるような長さ、またはライブラリーのプロービングもしくはプライミングのための低コピー数(一般的に5未満、一般的に3未満)である。一般的に、プローブまたはプライマーは、興味ある遺伝子と相補的であるか、または同一である配列の少なくとも14、16または30個の隣接するヌクレオチドを含む。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。

40

50

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用されるペプチドなる用語は、2以上のアミノ酸長および40以下のアミノ酸長であるポリペプチドを示す。本明細書において使用される、本明細書において提供されるアミノ酸の種々の配列に生じるアミノ酸は、既知の3文字または1文字略語にしたがって同定される(表1)。種々の核酸フラグメントに生じるヌクレオチドは、当該分野で日常的に使用される標準1文字記号で指定される。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用される「アミノ酸」は、アミノ基およびカルボン酸基を含む有機化合物である。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のために、アミノ酸は、20個の天然アミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ酸類似体(すなわち、 β -炭素が側鎖を有するアミノ酸)を含む。

10

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用される「アミノ酸残基」は、ポリペプチドのペプチド結合での化学消化(加水分解)時に形成されるアミノ酸を示す。本明細書に記載されているアミノ酸残基は、「L」異性体形態であると推定される。そのように指定される「D」異性体形態の残基は、所望の機能特性がポリペプチドにより維持される限り、任意のL-アミノ酸残基と置き換えることができる。NH₂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示す。COOH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示す。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。

20

表1 - 対応の表

【表1】

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	T y r	チロシン
G	G l y	グリシン
F	P h e	フェニルアラニン
M	M e t	メチオニン
A	A l a	アラニン
S	S e r	セリン
I	I l e	イソロイシン
L	L e u	ロイシン
T	T h r	スレオニン
V	V a l	バリン
P	P r o	プロリン
K	L y s	リシン
H	H i s	ヒスチジン
Q	G l n	グルタミン
E	G l u	グルタミン酸
Z	G l x	G l uおよび/またはG l n
W	T r p	トリプトファン
R	A r g	アルギニン
D	A s p	アスパラギン酸
N	A s n	アスパラギン
B	A s x	A s nおよび/またはA s p
C	C y s	システイン
X	X a a	未知またはその他

30

40

50

【 0 0 4 7 】

式により本明細書において示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慣用の方向に左から右の方向性を有する。加えて、「アミノ酸残基」なる語句は、対応の表(表1)に記載されているアミノ酸および修飾され異常なアミノ酸、例えば、37C.F.R. §§ 1.821-1.822(出典明示により本明細書に包含される)に言及されているものを含むように定義される。さらに、アミノ酸残基配列の前または後ろのダッシュが、1つ以上のアミノ酸残基のさらなる配列、アミノ末端基、例えば、NH₂またはカルボキシル末端基、例えば、COOHへのペプチド結合を示すということに注意すべきである。

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用される「天然 - アミノ酸」は、ヒトにおける同族mRNAコドンでの荷電tRNA分子の特異的な認識によりタンパク質に組み込まれる天然に見られる20種の - アミノ酸の残基である。したがって、非天然アミノ酸は、例えば、20種の天然アミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体を含み、限定はしないがアミノ酸のD-イソステレオマー(isostereomer)を含む。典型的な非天然アミノ酸は、本明細書に記載されており、当業者に知られている。

【 0 0 4 9 】

本明細書において使用されるDNA構築物は、本来は見られない方法において組み合わせられ、並べられた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他のコピーを含む。

【 0 0 5 0 】

本明細書において使用されるDNAセグメントは、特定の特質を有する大きな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フラグメントであり、これは、5'から3'の方向に読まれると、特定のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 5 1 】

本明細書において使用されるポリヌクレオチドなる用語は、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、インビトロで合成してもよく、または天然および合成分子の組合せから製造してもよい。ポリヌクレオチド分子の長さは、本明細書においてヌクレオチド(「nt」と省略される)または塩基対(「bp」と省略される)の単位で与えられる。ヌクレオチドなる用語は、文脈が許すとき、一本鎖および二本鎖分子に対して使用される。該用語が二本鎖分子に適用されるとき、全長を示すために使用され、塩基対なる用語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つの鎖が長さにおいてわずかに異なり、それらの末端がずれており、したがって、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かもしれないことを、当業者は認識している。このような対を形成していない末端は、一般的に、20ヌクレオチド長を超えない。

【 0 0 5 2 】

本明細書において使用される2つのタンパク質または核酸間の「類似性」は、タンパク質のアミノ酸配列または核酸のヌクレオチド配列間の関連性を示す。類似性は、残基の配列の同一性および/または相同性の程度およびその中に含まれる残基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、当業者に知られている。例えば、配列類似性を評価する1つの方法において、2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列を、配列間の最大レベルの同一性を生じる方法でアラインする。「同一性」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示す。アミノ酸配列およびある程度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)における保存的違いおよび/または頻繁な置換を考慮することができる。保存的違いは、関与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(すべての残基

10

20

30

40

50

を含む配列の全長にわたり、比較される配列のアラインメント)または局所的(最も類似した領域のみを含む配列の一部のアラインメント)であり得る。

【0053】

「同一性」は、それ自体、当該技術分野で認められた意味を有し、公開された技術を使用して計算することができる(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;およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991参照)。2つ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に多くの方法が存在するが、「同一性」なる用語は当業者によく知られている(Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

10

【0054】

本明細書において使用される相同(核酸および/またはアミノ酸配列に対して)は、約25%以上の配列相同性、一般的に25%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、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、必要なき、指定することができる。本明細書における目的のために「相同性」および「同一性」なる用語は、他に記載のない限り、しばしば互換的に使用される。一般的に、相同性または同一性パーセンテージの決定のために、配列は、最大順序のマッチが得られるようにアラインされる(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;および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)。配列相同性により、保存されたアミノ酸の数は、標準アラインメントアルゴリズムプログラムにより決定され、各供給業者により確立されたデフォルトギャップペナルティを使用することができる。実質的に相同な核酸分子は、一般的に、興味あ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または高ストリンジェンシーでハイブリダイズする。ハイブリダイズする核酸分子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。

20

30

【0055】

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否かは、既知のコンピューターアルゴリズム、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ーを使用する、例えば、「FASTA」プログラムを使用して決定することができる(他のプログラムは、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S.F., et al., J Mol 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を含む)。例えば、National Center for Biotechnology Information databaseのBLAST関数を、同一性を決定するために使用することができる。他の市販または公的に入手可能なプログラムは、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)を含む。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コンピュータープログラムを使用する配列情

40

50

報を比較することにより決定することができる（例えば、Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443、Smith and Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482により修正された）。簡潔には、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プログラムに対するデフォルトパラメーターは、(1) Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 358 (1979)に記載されている、単項比較行列（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の加重比較行列；(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)末端ギャップに対してペナルティーなしを含むことができる。

10

【0056】

したがって、本明細書において使用される、「同一性」または「相同性」なる用語は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較を示す。本明細書において使用される少なくとも「90%同一」なる用語は、参照核酸またはポリペプチドのアミノ酸配列と比較して90から99.99の同一性パーセントを示す。90%またはそれ以上のレベルの同一性は、例示目的のために、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と異なるという事実を示す。類似の比較を、試験および参照ポリヌクレオチド間で行うことができる。このような違いは、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示してもよく、また、それらは、最大許容、例えば、10/100アミノ酸の違い（約90%同一性）までで変化する長さの1または複数の位置で集中していてもよい。違いは、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%を越える相同性または同一性のレベルで、結果は、プログラムおよびギャップパラメータセットと無関係であるはずである。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のアラインメントにより容易に評価することができる。

20

【0057】

本明細書において使用されるアラインされる配列は、相同性（類似性および/または同一性）の使用を示し、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列における対応する位置をアラインする。一般的に、50%以上の同一性により関連している2つ以上の配列をアラインする。アラインされる配列のセットは、対応する位置でアラインされた2つ以上の配列を示し、ゲノムDNA配列とアラインされるRNA、例えば、ESTおよび他のcDNAに由来するアラインする配列を含むことができる。

30

【0058】

本明細書において使用される「プライマー」は、適当な条件下（例えば、4つの異なるヌクレオシド三リン酸および重合剤、例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素の存在下）で適当なバッファー中で適当な温度で鋳型指向性DNA合成の開始点として作用することができる核酸分子を示す。特定の核酸分子が「プローブ」および「プライマー」として働き得ることが理解される。しかしながら、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、種々の方法、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-介在PCRおよび他の増幅プロトコールにおいて使用することができる。

40

【0059】

本明細書において使用される「プライマー対」は、増幅される（例えば、PCRにより）配列の5'末端とハイブリダイズする5'（上流）プライマーおよび増幅される配列の3'末端の相補体とハイブリダイズする3'（下流）プライマーを含むプライマーのセットを示す。

50

【 0 0 6 0 】

本明細書において使用される「特異的にハイブリダイズする」は、標的核酸分子への核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）の相補的な塩基対合によるアニーリングを示す。当業者は、特異的ハイブリダイゼーションに影響するインピトロおよびインピボパラメーター、例えば、特定の分子の長さおよび組成に精通している。特にインピトロハイブリダイゼーションに関連するパラメーターは、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を更に含む。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典型的な洗浄条件は、 $0.1 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 65 であり、中程度のストリンジェンシーでは、 $0.2 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 50 である。同等のストリンジェンシー条件は、当該分野で知られている。当業者は、容易に、特定の適用に適当な標的核酸分子への核酸分子の特異的ハイブリダイゼーションを達成するためにこれらのパラメーターを調節することができる。相補的は、2つの核酸配列に関するとき、ヌクレオチドの2つの配列が、一般的に、対向するヌクレオチド間で 25% 、 15% または 5% 未満のミスマッチでハイブリダイズすることができることを意味する。必要なとき、相補性のパーセントは指定される。一般的に、2つの分子は、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に選択される。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書において使用される生成物と実質的に同一は、興味ある特性が十分に不変であり、実質的に同一の生成物を生成物の代わりに使用することができるように十分に類似であることを意味する。

20

【 0 0 6 2 】

本明細書において使用される「実質的に同一」または「類似」なる用語は、関連技術分野の当業者により理解される状況で変化することも理解される。

【 0 0 6 3 】

本明細書において使用される対立遺伝子変異体または対立遺伝子変異は、同じ染色体座を占有する遺伝子の2つ以上のすべての代替形態を示す。対立遺伝子変異は、変異を介して天然に生じ、集団内で表現型多型をもたらし得る。遺伝子変異は、サイレント（コードされるポリペプチドに変化なし）であり得、また、改変されているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。「対立遺伝子変異体」なる用語は、また、本明細書において、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使用される。一般的に、遺伝子の参照型は、種の集団または単一の参照メンバー由来のポリペプチドの野生型および/または優性型をコードする。一般的に、種間および種中の変異体を含む対立遺伝子変異体は、同じ種由来の野生型および/または優性型と少なくとも 80% 、 90% またはそれ以上のアミノ酸同一性を有する。同一性の程度は、遺伝子および比較が種間または種内であるか否かに依存する。一般的に、種内対立遺伝子変異体は、ポリペプチドの野生型および/または優性型と少なくとも約 80% 、 85% 、 90% または 95% またはそれ以上の同一性、例えば、野生型および/または優性型と 96% 、 97% 、 98% 、 99% またはそれ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の言及は、一般的に、同じ種のメンバー中のタンパク質の変異を示す。

30

【 0 0 6 4 】

本明細書において「対立遺伝子変異体」と互換的に使用される本明細書において使用される「対立遺伝子」は、遺伝子またはその一部の代替形態を示す。対立遺伝子は、相同染色体上の同じ遺伝子座または位置を占有する。対象が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有するとき、対象は、該遺伝子または対立遺伝子に対してホモ接合体であると言われる。対象が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有するとき、対象は、該遺伝子に対してヘテロ接合体であると言われる。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において互いに異なっていてよく、ヌクレオチドの修飾、例えば、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、変異を含む遺伝子の形態であり得る。

40

【 0 0 6 5 】

50

本明細書において使用される種変異体は、異なる種、例えば、異なる哺乳動物種、例えば、マウスおよびヒトの中のポリペプチドにおける変異体を示す。本明細書において提供される典型的な種変異体は、霊長類PH20、例えば、ヒト、チンパンジー、マカクザルおよびカニクイザルのものであるが、これらに限定されない。一般的に、種変異体は、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%の配列同一性を有する。種変異体間および中の対応する残基は、例えば、配列間の同一性が95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるように、一致するヌクレオチドまたは残基の数を最大限にするように配列を比較し、アラインすることにより決定することができる。次に、興味ある位置は、参照核酸分子に割り当てられる数を与える。特に、配列同一性が80%以上であるとき、アラインメントは、手動または肉眼により成し遂げることができる。例えば、図1におけるアラインメントは、ヒトPH20のアミノ酸残基491がチンパンジーPH20のアミノ酸残基491に対応し、ヒトPH20のアミノ酸残基497がチンパンジーPH20のアミノ酸残基498に対応することを示す。

10

【0066】

本明細書において使用されるスプライス変異体は、2種以上のmRNAをもたらすゲノムDNAの一次転写物の特異なプロセッシングにより生産される変異体を示す。

【0067】

本明細書において使用される修飾は、ポリペプチドのアミノ酸配列または核酸分子におけるヌクレオチドの配列の修飾に関連し、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方法論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。

20

【0068】

本明細書において使用されるプロモーターなる用語は、RNAポリメラーゼの結合および転写の開始を提供するDNA配列を含む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'非コード領域に見られる。

【0069】

本明細書において使用される、単離された、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れらの生物学的に活性な部分は、タンパク質が由来する細胞または組織に由来する細胞物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または、化学的に合成されたとき、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、純度を評価するために当業者により使用される分析の標準方法、例えば、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定されるとき、容易に検出可能な不純物を含まないとと思われるとき実質的に含まないと、または、さらなる精製により、物質の物理化学的特性、例えば、酵素的および生物学的活性を検出可能に変化しないとき、十分に純粋であると決定することができる。実質的に化学的に純粋な化合物を生産するための化合物の精製のための方法は、当業者に知られている。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であってよい。このような場合、さらなる精製が化合物の比活性を増大させ得る。

30

【0070】

したがって、実質的に精製されたポリペプチド、例えば、実質的に精製された延長された可溶性PH20の言及は、細胞物質を実質的に含まないPH20タンパク質の調製物を示し、単離されたか、または組換え的に生産される細胞の細胞成分から分離されたタンパク質の調製物を含む。1つの態様において、細胞物質を実質的に含まないなる用語は、約30%（乾燥重量で）未満の非酵素タンパク質（また、本明細書において夾雑タンパク質と称される）、一般的に、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的に生産されるとき、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%または5%未満を示す。

40

【0071】

50

本明細書において使用される、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないなる用語は、タンパク質が、タンパク質の合成に關与する化学的前駆体または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。該用語は、約30%（乾燥重量で）、20%、10%、5%未満の、またはさらに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。

【0072】

本明細書において使用される、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關する合成は、組換え方法および/または化学合成方法により生産される核酸分子またはポリペプチド分子を示す。

【0073】

本明細書において使用される組換え手段または組換えDNA方法を使用することによる生産は、クローン化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よく知られている方法の使用を意味する。

【0074】

本明細書において使用されるベクター（またはプラスミド）は、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別個のエレメントを示す。該ベクターは、一般的に、エピソームを維持するが、ゲノムの染色体への遺伝子またはその一部の組み込みを達成するように設計することができる。人工染色体、例えば、酵母人工染色体および哺乳動物人工染色体であるベクターも考慮される。このようなビヒクルの選択および使用は、当業者によく知られている。

【0075】

本明細書において使用される発現ベクターは、DNAフラグメントの発現を達成することができる調節配列、例えば、プロモーター領域と作動可能に連結したDNAを発現することができるベクターを含む。このようなさらなるセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列を含んでよく、所望により、1つ以上の複製起点、1つ以上の選択可能なマーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含んでよい。発現ベクターは、一般的にプラスミドまたはウイルスDNA由来であるか、または両方のエレメントを含み得る。したがって、発現ベクターは、組換えDNAまたはRNA構築物、例えば、プラスミド、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ン化DNAの発現をもたらす他のベクターを示す。適当な発現ベクターは、当業者によく知られており、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を含む。

【0076】

本明細書において使用されるベクターは、また、「ウイルスベクター(virus vector)」または「ウイルスベクター(viral vector)」を含む。ウイルスベクターは、外因性遺伝子を細胞に移すために（ビヒクルまたはシャトルとして）、外因性遺伝子に作動可能に連結している操作されたウイルスである。

【0077】

DNAセグメントに言及するとき、本明細書において使用される「作動可能に」または「作動可能に連結」は、セグメントが、意図される目的と一致して機能するように、例えば、転写がプロモーターの下流および任意の転写配列の上流で開始するように配置されていることを意味する。プロモーターは、通常、転写機構が転写を開始するために結合し、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ドメインである。

【0078】

本明細書において使用される「評価」なる用語は、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、視覚的もしくは他の値を得るという意味における定量的および定性的測定を含むことを意図する。評価は、直接的または間接的であってよく、実際に検出される化学種は、もちろん、タンパク質分解産物それ自体である必要はないが、例えば、その誘導体またはさらなる物質であり得る。例えば、相補体タンパク質の開裂産物の検出、例えば、

10

20

30

40

50

S D S - P A G E およびクマシーブルーでのタンパク質染色による。

【 0 0 7 9 】

本明細書において使用される生物学的活性は、化合物、組成物または他の混合物のインビボ投与時に起こる化合物のインビボ活性または生理学的応答を示す。したがって、生物学的活性は、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医薬活性を含む。生物学的活性は、このような活性を試験または使用するよう設計されたインビトロ系で観察することができる。したがって、本明細書における目的のためのプロテアーゼの生物学的活性は、ポリペプチドが加水分解される触媒活性である。

【 0 0 8 0 】

核酸の2つの配列に言及するとき、本明細書において使用される同等は、問題の2つの配列が同じアミノ酸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つのタンパク質またはペプチドに対する言及において使用されるとき、2つのタンパク質またはペプチドが、タンパク質またはペプチドの活性または機能を実質的に変化しないアミノ酸置換のみを有する、実質的に同じアミノ酸配列を有することを意味する。同等が特性に対して言及するとき、特性は同じ程度で存在する必要はないが（例えば、2つのペプチドは、異なる割合の同じ型の酵素活性を示し得る）、活性は、通常、実質的に同じである。

【 0 0 8 1 】

本明細書において使用される「調節する」および「調節」または「変更する」は、分子、例えば、タンパク質の活性の変化を示す。典型的な活性は、生物学的活性、例えば、シグナル変換を含むが、これらに限定されない。調節は、活性の増加（すなわち、上方調節またはアゴニスト活性）、活性の減少（すなわち、下方調節または阻害）または活性のあらゆる他の変化（例えば、周期性、頻度、期間、速度論または他のパラメーターにおける変化）を含み得る。調節は、文脈依存的であり得、一般的に調節は、指定された状態、例えば、野生型タンパク質、恒常的状态におけるタンパク質または指定された細胞型もしくは状態において発現されるタンパク質と比較される。

【 0 0 8 2 】

本明細書において使用される組成物はあらゆる混合物を示す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの任意の組合せであり得る。

【 0 0 8 3 】

本明細書において使用される組合せは、2つ以上の品目間または中の任意の関連性を示す。組合せは、2つ以上の別々の品目、例えば、2つの組成物または2つの回収物であってもよく、それらの混合物、例えば、2つ以上の品目の単一の混合物、またはそれらのあらゆる変化物であり得る。組合せの要素は、一般的に機能的に関連または関係している。

【 0 0 8 4 】

本明細書において使用される「疾患または障害」は、感染、後天的な状態、遺伝的な状態を含むが、これらに限定されない原因または状態に起因する、同定可能な症状により特徴付けられる生物における病理学的状態を示す。本明細書における興味ある疾患および障害は、ECMの成分に関連するものである。

【 0 0 8 5 】

本明細書において使用される疾患または状態を有する対象を「処置する」は、対象の症状が部分的にまたは完全に緩和されるか、または処置後に静的のままであることを意味する。したがって、処置は、予防、治療および/または治癒を包含する。予防は、可能性のある疾患の防止および/または症状の悪化もしくは疾患の進行の防止を示す。処置は、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医薬的使用を含む。

【 0 0 8 6 】

本明細書において使用される薬学的に有効な薬剤は、あらゆる治療剤または生物活性剤を含み、例えば、麻酔剤、血管収縮剤、分散剤、慣用の治療剤、例えば、小分子薬、例え

10

20

30

40

50

ば、ビスホスホネート、および治療用タンパク質、例えば、インスリン、I g G分子、および抗体を含むが、これらに限定されない。

【0087】

本明細書において使用される治療剤は、あらゆる薬学的に有効な薬剤または生物活性剤、例えば、麻酔剤、血管収縮剤、分散剤、慣用の治療剤、例えば、小分子薬物、例えば、ビスホスホネート、ならびに治療タンパク質、例えば、インスリン、I g G分子および抗体を含むが、これらに限定されない。

【0088】

本明細書において使用される処置は、状態、障害もしくは疾患または他の適応症の症状が、改善するか、あるいは有益に改変されるあらゆる方法を意味する。

10

【0089】

本明細書において使用される治療効果は、疾患もしくは状態の症状を変化する、一般的に向上もしくは改善する、または疾患もしくは状態を治癒する対象の処置をもたらす効果を意味する。治療有効量は、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示す。

【0090】

本明細書において使用される「対象」なる用語は、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトを示す。

【0091】

本明細書において使用される患者は、疾患または障害の症状を示すヒト対象を示す。

20

【0092】

本明細書において使用される、例えば、医薬組成物または他の治療剤の投与による処置による特定の疾患または障害の症状の改善は、組成物または治療剤の投与に起因または関連し得る症状の永久、一時的、持続的、一過性であるかに関わらないあらゆる緩和を示す。

【0093】

本明細書において使用される防止または予防は、疾患または状態を発症する危険性が減少される方法を示す。

【0094】

本明細書において使用される「治療有効量」または「治療有効用量」は、治療効果を生み出すために少なくとも十分である、薬物、化合物、物質または化合物を含む組成物の量を示す。したがって、それは、疾患または障害の症状を予防、治癒、改善、阻止または部分的に阻止するために必要な量である。

30

【0095】

本明細書において使用される単位投与形態は、ヒトおよび動物対象に適当であり、当該分野で知られているように個別にパッケージされている物理的に別個の単位を示す。

【0096】

本明細書において使用される単回投与製剤は、直接投与のための製剤を示す。

【0097】

本明細書において使用される「製品」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、該用語は、パッケージングの同じまたは別々の品目に含まれる、治療剤と可溶性PH20、例えば、e s PH20を、またはe s PH20単独を含むことを意図する。

40

【0098】

本明細書において使用される流体は、流れることができるあらゆる組成物を示す。したがって、流体は、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他のこのような組成物を含む。

【0099】

本明細書において使用される「キット」は、本明細書において提供される組成物、ならびに、再構成、活性化ならびに送達、投与、診断および生物学的活性または特性の評価の

50

ための器具/デバイスを含むが、これらに限定されない目的のための他の品目の組合せを示す。キットは、所望により使用のための指示書を含む。

【0100】

本明細書において使用される細胞抽出物または溶解物は、溶解または破壊された細胞から作られる調製物または画分を示す。

【0101】

本明細書において使用される動物は、あらゆる動物を含み、例えば、霊長類、例えば、ヒト、ゴリラおよびサル、齧歯動物、例えば、マウスおよびラット、鳥類、例えば、ニワトリ、反芻動物、例えば、ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジ、プタおよび他の動物を含むが、これらに限定されない。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、あらゆる供給源、動物、植物、原核生物および真菌由来である。多数の酵素は、哺乳動物起源を含む動物起源のものである。

10

【0102】

本明細書において使用される対照は、試験パラメーターで処置されないか、または、それが血漿サンプルであるとき、興味ある状態に罹患していない正常ボランティア由来であり得る点を除き、試験サンプルと実質的に同一であるサンプルを示す。対照は、また、内部対照であり得る。

【0103】

本明細書において使用される単数形「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ていない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの細胞外ドメイン」を含む化合物への言及は、1つまたは複数の細胞外ドメインを含む化合物を含む。

20

【0104】

本明細書において使用される範囲および量は、「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」は、「約5個の塩基」および「5個の塩基」を意味する。

【0105】

本明細書において使用される「任意選択の」または「所望により」は、次に記載される事象または状況が生じるか生じないこと、および該記載が前記事象または状況が生じる場合およびそうで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る基は、該基が置換されていないか、または置換されていることを意味する。

30

【0106】

本明細書において使用されるあらゆる保護基、アミノ酸および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生化学命名法におけるIUPAC-IUB委員会((1972) Biochem. 11:1726参照)にしたがう。

【0107】

B. 概観

ヒアルロニダーゼは、ヒアルロン酸の加水分解を触媒し、それによりヒアルロン酸の粘度を低下させ、組織透過性を増加させる酵素である。PH20は、グリコシル化されているとき最適な活性を示す中性活性および酸性活性なヒアルロニダーゼである。ヒトPH20は、タンパク質のC-末端に接続している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の細胞外膜(leaflet)に固定されているGPIに固定されたタンパク質である。すべてのGPIに固定されたタンパク質へのGPIアンカーの付加は、-部位(一般的に、C-末端から約20-30個のアミノ酸に位置している)と呼ばれる特定のアミノ酸位置での開裂、およびERにおけるC-末端部分の除去後に起こる。このC-末端部分はGPIアンカー結合シグナル配列である。ヒトPH20のGPIアンカー結合シグナル配列は、配列番号:107に記載されている前駆体ポリペプチドのアミノ酸位置491-509に位置し、-部位は、アミノ酸位置490である。GPIに固定されたPH20ポリペプチド、例えば、ヒトPH20は、膜に結合しており、したがって、不溶性である。PH20の不溶性形態は、一般的に治療目的に適當ではない。

40

50

【 0 1 0 8 】

G P Iアンカーを欠いている P H 2 0 ポリペプチドは、ポリペプチドを膜に固定する G P I - 接続シグナル配列を含まないため、一般的に発現すると細胞により分泌される。P H 2 0 の可溶性形態は、また、G P Iアンカー結合シグナル配列内に残基を含むものを含むことも今回見出した。延長された可溶性 P H 2 0 (e s P H 2 0) ポリペプチドは、対応する野生型 P H 2 0 ポリペプチドの C - 末端で短縮されているが、G P Iアンカー結合シグナル配列に位置する 1 つ以上のアミノ酸残基を維持する可溶性 P H 2 0 タンパク質である。このような e s P H 2 0 ポリペプチドは、可溶性であり、治療用ポリペプチドとして、例えば、ヒアルロナン関連疾患または状態を処置するために、および/または他の薬剤、薬物およびタンパク質の分散および送達を促進、増強または増加させ、それにより共投与される薬剤、薬物またはタンパク質の薬物動態学および薬物動力学プロファイルを改善するための展着剤または分散剤として役立つために使用することができる。

10

【 0 1 0 9 】

1 . P H 2 0

精子表面タンパク質、精子接着分子 1、S P A M 1 または H Y A L 3 としても知られている P H 2 0 は、ヒアルロニダーゼである。ヒアルロニダーゼは、ヒアルロン酸 (ヒアルロナンまたはヒアルロン酸塩または H A としても知られている) を分解する酵素ファミリー、細胞外マトリックスの必須成分および間質バリアの主要な成分である。ヒアルロン酸の加水分解を触媒することにより、ヒアルロニダーゼは、ヒアルロン酸の粘度を低下させ、それにより、組織透過性を増加させる。そのようなものとして、ヒアルロニダーゼは、その分散および送達を増強させるための、ならびに共投与用薬剤、薬物またはタンパク質の薬物動態学および薬物動力学プロファイルを改善するための、例えば、他の薬剤、薬物およびタンパク質と共に、展着剤または分散剤として使用されている。

20

【 0 1 1 0 】

他の哺乳動物ヒアルロニダーゼのような P H 2 0 は、ヒアルロン酸の 1 - 4 グリコシド結合を四糖および六糖のような種々のオリゴ糖の長さに加水分解するエンド - α - N - アセチル - ヘキソサミニダーゼである。P H 2 0 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、ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸、例えば、C 4 - S および C 6 - S を分解することができる。P H 2 0 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り卵丘細胞の層の精子による浸透を補助する。P H 2 0 は、精子表面上およびリソソーム由来先体に位置し、ここで先体内膜と結合している。細胞膜 P H 2 0 は、中性 p H でのみヒアルロニダーゼ活性を有するが、先体内膜 P H 2 0 は、中性および酸性 p H の両方で活性を有する。ヒアルロニダーゼに加えて、P H 2 0 は、H A 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。

30

【 0 1 1 1 】

典型的な P H 2 0 タンパク質は、ヒト (配列番号 : 1 0 7 に記載されている前駆体ポリペプチド、配列番号 : 1 0 8 に記載されている成熟体ポリペプチド)、ウシ (配列番号 : 1 1 1 および 1 1 9)、ウサギ (配列番号 : 1 1 2)、ヒツジ (配列番号 : 1 1 3、1 1 8 および 1 2 0)、カニクイザル (配列番号 : 1 1 4)、モルモット (配列番号 : 1 1 5)、ラット (配列番号 : 1 1 6)、マウス (配列番号 : 1 1 7)、チンパンジー (配列番号 : 1 9 7) およびアカゲザル (配列番号 : 1 9 8) の P H 2 0 ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。ヒト P H 2 0 m R N A 転写物は、正常に翻訳されて、N - 末端に 3 5 個のアミノ酸のシグナル配列 (配列番号 : 1 0 7 のアミノ酸残基位置 1 - 3 5) を含む 5 0 9 個のアミノ酸の前駆体ポリペプチド (配列番号 : 1 0 7) を生産する。したがって、E R への輸送およびシグナルペプチドの除去後、配列番号 : 1 0 8 に記載されているアミノ酸配列を有する 4 7 4 個のアミノ酸の成熟体ポリペプチドが生産される。以下に記載されているとおり、次に C - 末端ペプチドが E R において開裂され、配列番号 : 1 0 7 に記載されている前駆体ポリペプチドの位置 4 9 0 に対応するアミノ酸位置で新規に形成される C 末端アミノ酸との G P Iアンカーの共有結合を容易にする。

40

50

【 0 1 1 2 】

ヒトPH20は、一般的に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に固定されている原型的な中性活性なヒアルロニダーゼである。上記のとおり、PH20は、また、先体内膜上に発現され、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。証拠は、配列番号：107に記載されている前駆体ポリペプチドのアミノ酸142-172に対応するPH20のペプチド1領域が、中性pHで酵素活性に必要であることを示唆する。配列番号：107に記載されている前駆体ポリペプチドのアミノ酸277-297に対応するペプチド3領域は、酸性pHで酵素活性に重要であると思われる(Cherr et al., (2001) Matrix Biology 20:515-525)。したがって、PH20は2つの触媒部位を含むと思われる。触媒部位に加えて、PH20は、また、ヒアルロニタン結合部位を含む。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：107に記載されている前駆体ポリペプチドのアミノ酸位置205-235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。

10

【 0 1 1 3 】

a. グリコシル化

いくつかのヒアルロニタン分解酵素、例えば、ヒアルロニダーゼのグリコシル化、例えば、NおよびO結合型グリコシル化は、その触媒活性および安定性にとって重要であり得る。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)に分類され、そのすべてが、-Asn-Xaa-Thr/Ser-配列(ここで、XaaはProではない)内に含まれるAsn残基のアミド窒素を介して結合している(Man)₃-GlcNAc-GlcNAc-コアを有する。-Asn-Xaa-Cys-でのさらなるグリコシル化部位は、凝固タンパク質Cについて報告されている。場合によっては、ヒアルロニタン分解酵素、例えば、ヒアルロニダーゼは、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ことができる。例えば、PH20は、アミノ酸T475で1つのO結合型オリゴ糖ならびに配列番号：107に例示されるヒトPH20のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393で6つのN結合型オリゴ糖を有する。アミノ酸残基N82、N166およびN254は複合型グリカンにより占有されるが、アミノ酸残基N368およびN393は高マンノース型グリカンにより占有される(例えば、以下の実施例6参照)。アミノ酸残基N235は、約80%の高マンノース型グリカンおよび20%の複合型グリカンにより占有される。

20

30

【 0 1 1 4 】

糖タンパク質を修飾するグリカンの型を変更することは、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、多数の酵素は、最適な酵素活性のためにグリコシル化を必要とすると考えられていない。いくつかのヒアルロニダーゼにおいて、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す。したがって、このようなヒアルロニダーゼにおいて、N結合型グリカンの存在が活性な酵素の作製に必要である。PH20ポリペプチドにおけるN結合型グリカンの存在は、活性な酵素を生産するために必要である。例えば、エンドグリコシダーゼPNGaseFまたはGlcNAcホスホトランスフェラーゼ(GPT)阻害剤ツニカマイシンでの処理によるヒトPH20の完全な脱グリコシル化は、ヒアルロニダーゼ活性の全喪失をもたらすことを今回見出した(例えば、以下の実施例7-8参照)。対照的に、エンドグリコシダーゼEndoF1、EndoF2、EndoF3またはEndoHでの処理によるヒトPH20の部分的な脱グリコシル化は、ヒトPH20のヒアルロニダーゼ活性に影響しない(例えば、以下の実施例7参照)。

40

【 0 1 1 5 】

b. GPI固定

ヒトPH20はGPIに固定されたタンパク質である。PH20ポリペプチドそれ自体は、タンパク質のC-末端に接続した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の細胞外膜に固定されている。GPIに固定されたタンパク質、

50

例えば、ヒトPH20は、小胞体(ER)へタンパク質を指向する開裂できるN-末端シグナルペプチドで翻訳される。これらのタンパク質のC-末端は、ERの内腔内においてポリペプチドへあらかじめ形成されたGPIアンカーの付加を指向する別のシグナル配列である。GPIアンカーの付加は、 Asn^n -部位(一般的に、C-末端から約20-30個のアミノ酸に位置している)と呼ばれる特定のアミノ酸位置でのC-末端部分の開裂後に起こる。 Asn^n -部位の位置を同定するためのコンセンサス配列がないようだが、GPIに固定されたタンパク質は、一般的に Asn^n -部位のすぐ下流の8-12個のアミノ酸の親水性スパーサー領域の前に、8-20個のアミノ酸の主に疎水性領域を含む、C-末端GPIアンカー結合シグナル配列またはドメインを含む。この親水性スパーサー領域は、しばしば、荷電アミノ酸およびプロリンが豊富である(White et al., (2000) J. Cell Sci. 113(Pt 10.4):721-727)。より詳細な分析によって、少量の予測二次構造により特徴付けられる Asn^{n-1} 位置より前の約11個のアミノ酸の領域、小さい側鎖残基の存在により特徴付けられる Asn^{n-1} から Asn^{n+2} の開裂部位(Asn^n -部位)周囲の領域、位置 Asn^{n+3} から Asn^{n+9} 間のスパーサー領域、および Asn^{n+10} からC-末端の疎水性テールが存在することを示唆する(Pierleoni et al., (2008) BMC Bioinformatics 9:392)。

【0116】

GPIアンカー結合シグナルコンセンサス配列は存在しないが、ポリペプチドにおけるこのような配列を同定するために使用することができる種々のコンピューターによる方法およびアルゴリズム(例えば、Udenfriend et al. (1995) Methods Enzymol. 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) J. Biol. Chem. 292: 741-758; Kronegg and Buloz, (1999), "Detection /prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGP1)," 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) Bioinformatics 21:1846-1852; Omaetxebarria et al., (2007) Proteomics 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) BMC Bioinformatics 9:392参照)、例えば、バイオインフォマティクスウェブサイト、例えば、Expasy Proteomics ツールサイト(expasy.ch/tools/)で容易に利用できるものが開発されている。したがって、当業者は、PH20ポリペプチドがGPIアンカー結合シグナル配列を含むか否か、したがって、PH20ポリペプチドがGPIに固定されたタンパク質であるか否かを決定することができる。

【0117】

ヒトPH20のGPIアンカー結合シグナル配列は、配列番号:107に記載されている前駆体ポリペプチドのアミノ酸位置491-509に位置し、 Asn^n -部位は、アミノ酸位置490である。したがって、ヒトPH20のこのモデリングにおいて、アミノ酸491-509はERへの輸送後に開裂し、GPIアンカーは位置490でセリン残基に共有結合する。ヒトPH20のC-末端へのGPIアンカーの共有結合、したがって、PH20の膜結合性質は、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)加水分解試験を使用して行われている(例えば、Lin et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:1157-1163および以下の実施例3参照)。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)およびD(PI-PLD)は、GPIアンカーを加水分解し、PH20ポリペプチドを細胞膜から放出する。したがって、得られる放出されるPH20ポリペプチドは可溶性である。可溶性PH20は、当該分野でよく知られている方法、例えば、限定はしないが、以下および実施例4に記載されているTriton(登録商標)X-114アッセイを使用するものを使用して、不溶性の膜結合PH20から検出および区別することができる。このアッセイにおいて、可溶性PH20ヒアルロニダーゼは37℃に温められたTriton(登録商標)X-114溶液の水相に分配するが(Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7)、膜に固定されたPH20ヒアルロニダーゼは界面活性剤リッチな相に分配する。したがって、当然にPH20ポリペプチドがGPIに固定されているか否かを評価するアルゴリズムの使用に加えて、溶解度実験も行うことができる。

【0118】

C. 延長された可溶性PH20ポリペプチド

10

20

30

40

50

本明細書において提供されるものは、延長された可溶性PH20(esPH20)ポリペプチドおよび組成物である。典型的な本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、霊長類esPH20ポリペプチド、例えば、ヒトおよびチンパンジーesPH20ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは可溶性であり、すなわち、C-末端で短縮されているが、対応する野生型PH20ポリペプチドのGPIアンカー結合シグナル配列に位置する少なくとも1つ以上のアミノ酸残基を維持するPH20タンパク質を分泌する(例えば、アミノ酸位置491-500で短縮されている)。esPH20ポリペプチドは、GPIに固定されたPH20ポリペプチドの修飾により、すなわち、GPIアンカー結合シグナル配列の部分の除去により、いずれかのGPIに固定されたPH20ポリペプチドから生産することができる(ただし、得られるesPH20ポリペプチドは可溶性である)。溶解度または細胞培養培地への分泌は、発現時にSDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析により、あるいは、PH20ポリペプチドが組換え発現およびポリペプチド合成を含む当業者に知られているあらゆる方法により生産されるとき、以下および実施例4に記載されているTriton(登録商標)X-114アッセイにおいて測定することができる。本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、その分散および送達を増強させるための、ならびに共投与用薬剤、薬物またはタンパク質の薬物動態学および薬物動力学プロフィールを改善するための、他の薬剤、薬物およびタンパク質と共に、例えば、治療用ポリペプチドとして、例えば、展着剤または分散剤として使用することができる。

10

【0119】

20

本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、esPH20ポリペプチドが可溶性である、すなわち、以下に記載されるTriton(登録商標)X-114溶液の水相へ分配される限り、GPIアンカー結合シグナル配列中の1、2、3、4、5、6、7個またはそれ以上のアミノ酸残基を含む。本明細書において提供される延長された可溶性PH20ポリペプチドは、あらゆる自然にGPIに固定されたPH20ポリペプチドからC-末端切断することにより生産することができ、ここで、得られるesPH20ポリペプチドは可溶性であり、GPIアンカー結合シグナル配列由来の1個または複数のアミノ酸残基を含む。当業者は、PH20ポリペプチドがGPIに固定されているか否かを、当該分野でよく知られている方法を使用して決定することができる。このような方法は、GPIアンカー結合シグナル配列および部位の存在および位置を予測する既知の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)で消化の前後の溶解度分析を実施することを含むが、これらに限定されない。

30

【0120】

典型的なesPH20ポリペプチドは、霊長類のesPH20ポリペプチド、例えば、ヒトおよびチンパンジーesPH20ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。例えば、本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、配列番号:107、108または197に記載されている成熟体または前駆体ポリペプチド、またはそれらの対立遺伝子もしくは他の変異、例えば、それらの活性なフラグメントのいずれかのC-末端切断により作ることができる(ここで、得られるポリペプチドは可溶性であり、GPIアンカー結合シグナル配列由来の1個以上のアミノ酸残基を維持する)。対立遺伝子変異体および他の変異体は、当業者に知られており、配列番号:107、108および197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、野生型ポリペプチド、例えば、配列番号:107、108および197に記載されている配列を有する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-末端短縮され得る、ただし、得られるesPH20ポリペプチドは可溶性であり、GPIアンカー結合シグナル配列由来の1個以上のアミノ酸残基を維持する。

40

【0121】

50

本明細書において提供される延長された可溶性PH20ポリペプチドは、ヒアルロニダーゼ活性を維持している。さらに、esPH20ポリペプチドは中性活性である、すなわち、それらは中性pHでヒアルロニダーゼ活性を維持している。ヒアルロニダーゼ活性は、PH20の野生型のGPIに固定された形態と比較して、増加または減少し得る。例えば、本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態により示されるヒアルロニダーゼ活性の1%、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し得る。

【0122】

1. ヒトesPH20ポリペプチド

本明細書において提供される典型的なesPH20ポリペプチドは、ヒトesPH20ポリペプチドである。本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは可溶性であり、GPIアンカー結合シグナル配列由来の1個以上のアミノ酸残基を含む。したがって、本明細書において提供されるものは、GPIがGPIアンカー結合シグナル配列を完全に欠いていないヒトPH20の可溶性形態である。

【0123】

本明細書において提供される前駆体ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸1からアミノ酸491、492、493、494、495、496、497、498、499または500を含むポリペプチドを生産するようにC-末端切断を有するものを含むが、これらに限定されない。哺乳動物細胞において発現されるとき、35個のアミノ酸のN-末端シグナル配列はプロセッシング中に開裂され、タンパク質の成熟形態を分泌する。したがって、成熟体ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：107のアミノ酸36から491、492、493、494、495、496、497、498、499または500を含む。したがって、本明細書において提供される成熟体ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：59-63または100-104に記載されているものまたはそれらの対立遺伝子もしくは他の変異体を含む。

【0124】

本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、CHO細胞において発現されるか、あるいは任意の細胞において、または当業者に知られている任意の方法により生産され得る（ただし、それらは、可溶性であり、GPIアンカー結合シグナル配列由来の少なくとも1個のアミノ酸を含む）。CHO細胞において生産される可溶性ヒトesPH20ポリペプチドは、細胞培養培地に分泌されるものである。ヒトesPH20が部分的に分泌され得る、すなわち、発現されるポリペプチドの50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が培養培地に分泌されることは当業者に理解される（ただし、分泌されるesPH20は可溶性である、すなわち、以下に記載されているTriton（登録商標）X-114溶液の水相に分配する）。アミノ酸1-500または36-500を含む本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、部分的に分泌される。さらに、CHO細胞において発現されるとき、アミノ酸1から498、499または500を含む前駆体ヒトesPH20ポリペプチドまたはアミノ酸36から498、499または500を含む成熟体ヒトesPH20ポリペプチドは、1週間毎に発現される（例えば、以下の実施例3参照）。

【0125】

したがって、典型的な前駆体ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸1からアミノ酸491、492、493、494、495、496または497を含むポリペプチドを生産するようにC-末端切断を有するあらゆるものを含むが、これらに限定されない。哺乳動物細胞において発現されるとき、プロセッシング中のN-末端シグナルペプチドの開裂後、成熟体ヒトesPH20ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、配列番号：107のアミノ酸36から491、492、493、494、495、496または497を含む。したがって、本明細書において提供される典型的な成熟体ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：60-63および102-104のいずれかに記載されているような456、457、458、459、460、461または462アミノ酸長であるものまたはそれらの対立遺伝子もしくは他の変異体を含む。対立遺伝子変異体および他の変異体は、当業者に知られており、配列番号：107または108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。

【0126】

また、本明細書において提供されるものは、アミノ酸置換ヒトesPH20ポリペプチドである。アミノ酸置換esPH20ポリペプチドは、例えば、配列番号：60-63および102-104に記載されているような、本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドと比較して、アミノ酸置換を含むように修飾されているヒトesPH20ポリペプチドである。したがって、アミノ酸置換ヒトesPH20ポリペプチドは、C-末端切断を有するものである。いくつかの例において、本明細書において提供されるアミノ酸置換ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸1から491、492、493、494、495、496または497、またはアミノ酸36から491、492、493、494、495、496または497に記載されているアミノ酸配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、87%、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。他の例において、アミノ酸置換ヒトesPH20ポリペプチドは、配列番号：60-63および102-104に記載されているアミノ酸配列と85%、87%、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。

【0127】

本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、PH20の野生型のGPIに固定された形態と比較して、増加または減少しているヒアルロニダーゼ活性を示し得る。例えば、本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態により示されるヒアルロニダーゼ活性の1%、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し得る。いくつかの例において、ヒトesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態と比較して、ヒアルロニダーゼ活性の増加を示す。ヒトesPH20ポリペプチドのヒアルロニダーゼ活性は、野生型のGPIに固定された形態のヒアルロニダーゼ活性と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、300%、400%、500%、1000%またはそれ以上増加し得る。

【0128】

本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、中性活性であるヒアルロニダーゼ活性、または中性pHで測定されたとき、PH20の野生型のGPIに固定された形態と比較して増加または減少するヒアルロニダーゼ活性を示す。例えば、本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態により示されるヒアルロニダーゼ活性の1%、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し得る。いくつかの例において、ヒトesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態と比較して、中性活性であるヒアルロニダーゼ活性の減少を示す。中性活性であるヒアルロニダーゼ活性は、野生型のGPIに固定さ

10

20

30

40

50

れた形態の中性活性であるヒアルロニダーゼ活性と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上減少し得る。他の例において、ヒトesPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態と比較して、中性活性であるヒアルロニダーゼ活性の増加を示す。中性活性であるヒアルロニダーゼ活性は、野生型のGPIに固定された形態の中性活性であるヒアルロニダーゼ活性と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、300%、400%、500%、1000%またはそれ以上増加し得る。

【0129】

グリコシル化がこれらのポリペプチドの触媒活性および安定性のために重要であるため、一般的に、ヒトesPH20ポリペプチドはポリペプチドが活性を確実に保持するように正しいN-グリコシル化を容易にするタンパク質発現系を使用して生産される。esPH20ポリペプチドの組換え発現のために有用な典型的な細胞は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(例えば、DG44 CHOまたはCHO-S細胞)を含む。

【0130】

2. 他の種のesPH20ポリペプチド

本明細書において提供されるものは、非ヒト延長された可溶性PH20ポリペプチドである。当業者は、延長された可溶性PH20ポリペプチドを生産するためにC-末端切断を作ることができる、配列番号：107に記載されているヒトPH20ポリペプチドの位置491-500に対応する位置を同定するために、ヒトPH20のアミノ酸配列を任意の非ヒトPH20ポリペプチドとアラインすることができる。さらに、本明細書の他の部分に記載されているもののようなアルゴリズムを、GPIアンカー結合シグナル配列の位置を予測するために使用することができる。C-末端短縮ポリペプチドの溶解度を、生産されたC-末端短縮ポリペプチドが可溶性であるか、したがって、esPH20ポリペプチドであるかを同定するために、以下および実施例4に記載されているTriton(登録商標)X-114アッセイを含む当該分野でよく知られている方法を使用して評価することができる。

【0131】

本明細書においてされるものは、非ヒト霊長類種の延長された可溶性PH20ポリペプチドである。典型的な非ヒト霊長類のGPIに固定されたPH20ポリペプチドは、チンパンジーPH20(配列番号：197)を含むが、これらに限定されない。したがって、本明細書において提供されるものは、チンパンジーesPH20ポリペプチドである。本明細書において提供されるチンパンジーのesPH20ポリペプチドは、ヒトesPH20ポリペプチドに対して上記のC-末端切断に対応するC-末端切断を含む。したがって、本明細書において提供されるチンパンジーesPH20ポリペプチドは、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸残基1から491、492、493、494、495、496、497、498、499、500または501に対応するアミノ酸を含む。

【0132】

チンパンジーPH20ポリペプチドを、当業者に知られている任意の方法によりヒトPH20ポリペプチドとアラインすることができる。このような方法は、一般的に一致を最大にし、例えば、手動アラインメントを使用する方法ならびに利用できる多数のアラインメントプログラム(例えば、BLASTP)および当業者に知られている他のものを使用することによる方法を含む。図1は、ヒトおよびチンパンジーPH20の前駆体ポリペプチドのアラインメントを提供する。ヒトPH20のアミノ酸残基491から500(本明細書において提供されるヒトesPH20ポリペプチドは、野生型ヒトPH20ポリペプチドと比較して短縮されている)は、チンパンジーPH20のアミノ酸残基491から501に対応する。したがって、本明細書において提供されるものは、配列番号：197に

10

20

30

40

50

記載されているアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 から 491、492、493、494、495、496、497、498、499、500 または 501 を含むチンパンジー es PH20 ポリペプチドである。哺乳動物細胞において発現されるとき、35 個のアミノ酸のシグナル配列はプロセッシング中に開裂され、タンパク質の成熟形態を分泌する。したがって、成熟体チンパンジー es PH20 ポリペプチドは、配列番号：197 のアミノ酸 36 から 491、492、493、494、495、496、497、498、499、500 または 501 を含む。

【0133】

典型的なチンパンジー es PH20 ポリペプチドは、配列番号：197 に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 から 491、492、493、494、495、496、497 または 498 を含むものである。哺乳動物細胞において発現されるとき、35 個のアミノ酸のシグナルペプチドはプロセッシング中に開裂され、タンパク質の成熟形態を分泌する。したがって、成熟体チンパンジー es PH20 ポリペプチドは、配列番号：197 のアミノ酸 36 から 491、492、493、494、495、496、497 または 498 を含む。

【0134】

D. 部分的に N - グリコシル化されている PH20 ポリペプチド

本明細書において提供されるものは、N - グリコシル化されたヒアルロニダーゼのヒアルロニダーゼ活性のすべてまたは一部を維持している、部分的に脱グリコシル化された PH20 ポリペプチドを含む部分的に N - グリコシル化されたヒアルロニダーゼである。典型的な部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、何らかの種由来の部分的に脱グリコシル化された PH20 ポリペプチド、例えば、配列番号：107 - 109、111 - 120、197 および 198 のいずれかに記載されているもの、またはそれらの対立遺伝子変異体もしくは他の変異体を含む。対立遺伝子変異体および他の変異体は当業者に知られており、配列番号：107 - 109、111 - 120、197 および 198 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れらの短縮された形態を含む。本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、また、ハイブリッド、融合およびキメラの部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼおよび部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼ複合体を含む。

【0135】

本明細書において提供される部分的に N - グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、1 つ以上のグリコシダーゼでの消化により生産することができる。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：107 に例示されているヒト PH20 のアミノ酸 N82、N166、N235、N254、N368 および N393 での部位）がグリコシル化され得るが、グリコシル化の程度は、1 つ以上のグリコシダーゼで消化されないヒアルロニダーゼと比較して減少する。本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼポリペプチド、例えば、部分的に脱グリコシル化された可溶性 PH20 ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼ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。1 つの例において、高マンノースまたは複合型グリカンを含まず、むしろ少なくとも 1 つの N - アセチルグルコサミン部分を含むように、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166、N235、N254、N368 および N393 に対応する 1、2、3、4、5 または 6 個の N - グリコシル化部位は、部分的に脱グリコシル化される。いくつかの例において、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166 および N254 に対応する 1、2 または 3 個の N - グリコシル化部位は脱グリコシル化されており、すなわち、それらが糖部分を含まない。他の例において、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166、N235、N254、N368 および N393 に対応する 3、4、5 または 6 個の N - グリコシル化部位がグリコシル化される。グリコシル化されるアミノ酸残基は、最小限、1 つの N - アセチルグルコサミン部分を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

また、本明細書において提供されるものは、部分的にN-グリコシル化されているC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドである。本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、全長PH20ポリペプチド、例えば、配列番号：107-109、111-120、197および198に記載されているいずれかのもののC-末端から1個以上のアミノ酸を欠いている。したがって、本明細書において提供される部分的にN-グリコシル化されているC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、全長野生型ポリペプチド、例えば、配列番号：107-109、111-120、197および198に記載されている配列を有する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-末端短縮され得る。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN-グリコシル化部位がグリコシル化される。グリコシル化されるアミノ酸残基は、最小限、1つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。他の例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2または3個のN-グリコシル化部位は、グリコシル化されない。さらなる例において、ヒアルロニダーゼ活性を維持する限り、部分的にグリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドが高マンノースおよび複合型グリカンを含まず、むしろ少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン部分を含むように、グリコシル化の程度を減少させることができる。したがって、本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20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。

10

20

【 0 1 3 7 】

本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドおよびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、ヒアルロニダーゼ活性を維持している。さらに、部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドおよびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは中性活性である、すなわち、それらは中性pHでヒアルロニダーゼ活性を維持している。ヒアルロニダーゼ活性は、グリコシル化された全長およびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドと比較して、増加または減少し得る。例えば、本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドおよびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、グリコシル化された全長およびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドにより示されるヒアルロニダーゼ活性の1%、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し得る。

30

【 0 1 3 8 】

したがって、本明細書において提供されるPH20ポリペプチドは、例えば、ヒアルロニダーゼ関連疾患または状態を処置するための、治療用ポリペプチドとして使用することができる。部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドおよびC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドも、また、例えば、併用療法において使用することができる。

40

【 0 1 3 9 】

1. PH20ポリペプチド

本明細書において提供される典型的な部分的にN-グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、何らかの種由来の部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチド、例えば、配列番号：107-109、111-120、197および198のいずれかに記載されているもの、またはそれらの対立遺伝子変異体もしくは他の変異体を含む。対立遺伝子変異体および他の変異体は当業者に知られており、配列番号：107-109、111-1

50

20、197および198のいずれかまたはそれらの短縮された形態と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。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN-グリコシル化部位がグリコシル化される。他の例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166およびN254に対応する1、2または3個のN-グリコシル化部位は、グリコシル化されない。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2、3、4、5または6個のN-グリコシル化部位は、最小限、1つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。

10

【0140】

本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、1つ以上のグリコシダーゼでの消化により生産することができる。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：107に例示されているヒトPH20のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393での部位）がグリコシル化され得るが、グリコシル化の程度は、1つ以上のグリコシダーゼで消化されないヒアルロニダーゼと比較して減少する。特に、部分的にグリコシル化されたヒアルロニダーゼは、N結合型グリコシル化部位のそれぞれで少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン部分を維持する。部分的にグリコシル化されたヒアルロニダーゼは、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN-グリコシル化部位でグリコシル化され得る。いくつかの例において、ヒアルロニダーゼは、配列番号：107のアミノ酸残基N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2または3個のN-グリコシル化部位で脱グリコシル化されている。本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼ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。

20

【0141】

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、2つの小さな糖を生産する酵素である。図2に示されるとおり、脊椎動物におけるN-グリカンの主要な型は、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型グリカンを含む。高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを開裂するEndoF1；二分岐複合型グリカンを開裂するEndoF2；二分岐およびそれ以上の分岐複合型グリカンを開裂するEndoF3；および高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを開裂するEndoHを含む部分タンパク質脱グリコシル化をもたらしいくつかのグリコシダーゼがある（図3）。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20の、1種またはすべてのこれらのグリコシダーゼでの処理は、部分脱グリコシル化のみもたらし、したがって、ヒアルロニダーゼ活性の維持をもたらし得る。

30

【0142】

例えば、rHuPH20の、1種またはすべてのグリコシダーゼでの処理は、部分脱グリコシル化をもたらし。これらの部分的に脱グリコシル化されたrHuPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化された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す（例えば、実施例7参照）。対照的に、rHuPH20（配列番号：122）の、すべてのN-グリカンを開裂するグリコシダーゼであるPNGaseFでの処理（図3参照）、またはGlcNAcホスホトランスフェラーゼ（GPT）阻害剤ツニカマイシンでの処理は、すべてのN-グリカンの完全脱グリコシル化をもたらし、それによりPH20を酵素的に不活性にする（例えば、以下の実施例7-8参照）。

40

【0143】

本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼポリペプチド、例えば、部分的に脱グリコシル化された可溶性PH20ポリペプチドは、完全にグ

50

リコシル化されたヒアルロニダーゼのグリコシル化レベルの10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%を有し得る。一般的に、本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼ、例えば、部分的に脱グリコシル化された可溶性PH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼにより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。

【0144】

本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、また、ハイブリッド、融合およびキメラの部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼおよび部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼ複合体を含む。

【0145】

2. C - 末端を短縮されたPH20ポリペプチド

本明細書において提供される典型的な部分的にN - グリコシル化された、または部分的に脱グリコシル化されたPH20ペプチドは、C - 末端を短縮されたPH20ポリペプチドである。本明細書において提供される部分的にグリコシル化されたC - 末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、配列番号：107 - 109、111 - 120、197および198に記載されている全長PH20ポリペプチドのC - 末端由来の1個以上のアミノ酸を欠いている。したがって、本明細書において提供される部分的にグリコシル化されたC - 末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、全長野生型ポリペプチド、例えば、配列番号：107 - 109、111 - 120、197および198に記載されている配列を有する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 - 末端短縮され得る。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN - グリコシル化部位がグリコシル化される。他の例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166およびN254に対応する1、2または3個のN - グリコシル化部位は、グリコシル化されない。

【0146】

本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたC - 末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、1つ以上のグリコシダーゼでの消化により生産することができる。すべてのN結合型グリコシル化部位（例えば、配列番号：107に例示されているヒトPH20のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393での部位）がグリコシル化され得るが、グリコシル化の程度は、1つ以上のグリコシダーゼで消化されないヒアルロニダーゼと比較して減少する。したがって、本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化されたC - 末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼ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。特に、部分的にN - グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、N結合型グリコシル化部位のそれぞれで少なくとも1つのN - アセチルグルコサミン部分を維持する。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2、3、4、5または6個のN - グリコシル化部位は、最小限、1つのN - アセチルグルコサミン部分を含む。他の例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN - グリコシル化部位は、3、4、5または6個のN - グリコシル化部位のそれぞれで、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼのグリコシル化のレベルでグリコシル化される。さらなる例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2または3個のN - グリコシル化部

10

20

30

40

50

位は、完全に脱グリコシル化される。これらの例において、一般的に、アミノ酸 N 8 2、N 1 6 6 または N 2 5 4 は、完全に脱グリコシル化される。

【 0 1 4 7 】

典型的な部分的に N - グリコシル化された C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、何らかの種由来のもの、例えば、配列番号： 1 0 7 - 1 0 9、 1 1 1 - 1 2 0、 1 9 7 および 1 9 8 のいずれかに記載されているもの、またはそれらの対立遺伝子変異体もしくは他の変異体である。対立遺伝子変異体および他の変異体は当業者に知られており、配列番号： 1 0 7 - 1 2 0、 1 9 7 および 1 9 8 のいずれかまたはそれらの短縮された形態と 6 0 %、 7 0 %、 8 0 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 % 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部分的に N - グリコシル化されている C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、また、ハイブリッド、融合およびキメラの P H 2 0 ポリペプチドおよび P H 2 0 複合体を含む。例えば、本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、ポリマー、例えば、デキストラン、ポリエチレングリコール（ペグ化（ P E G ））またはシアリル部分、または他のこのようなポリマー、例えば、天然または糖ポリマーと複合体化し得る。他の例において、部分的に N - グリコシル化された C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、ドメイン、例えば、 I g G 免疫グロブリン由来の F c ドメインと連結または融合させる。

10

【 0 1 4 8 】

本明細書において提供されるグリコシル化または部分的に脱グリコシル化 C - 末端短縮ポリペプチドに含まれるものは、配列番号： 1 0 7（前駆体ポリペプチド）または 1 0 8（成熟体ポリペプチド）に記載されている野生型 P H 2 0 と比較して 2 個アミノ酸から 4 4 個のアミノ酸が C - 末端で短縮されているもの、またはそれらの対立遺伝子または種変異体である。したがって、C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、グリコシル化された配列番号： 1 0 7 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 に対応する 2、 3、 4、 5 または 6 個の N - グリコシル化部位を有する、配列番号： 1 0 7 に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸 1 からアミノ酸 4 5 0、 4 5 1、 4 5 2、 4 5 3、 4 5 4、 4 5 5、 4 5 6、 4 5 7、 4 5 8、 4 5 9、 4 6 0、 4 6 1、 4 6 2、 4 6 3、 4 6 4、 4 6 5、 4 6 6、 4 6 7、 4 6 8、 4 6 9、 4 7 0、 4 7 1、 4 7 2、 4 7 3、 4 7 4、 4 7 5、 4 7 6、 4 7 7、 4 7 8、 4 7 9、 4 8 0、 4 8 1、 4 8 2、 4 8 3、 4 8 4、 4 8 5、 4 8 6、 4 8 7、 4 8 8、 4 8 9、 4 9 0、 4 9 1、 4 9 2、 4 9 3、 4 9 4、 4 9 5、 4 9 6、 4 9 7、 4 9 8、 4 9 9、 5 0 0、 5 0 1、 5 0 2、 5 0 3、 5 0 4、 5 0 5、 5 0 6 または 5 0 7、 または、それらの対立遺伝子または種変異体における対応する位置を含むポリペプチドを生産する C - 末端切断を有するあらゆるものを含む。哺乳動物細胞において発現されるとき、 3 5 個のアミノ酸の N - 末端シグナル配列はプロセッシング中に開裂され、タンパク質の成熟形態を分泌する。したがって、本明細書において提供されるものは、グリコシル化される配列番号： 1 0 7 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 に対応する 3、 4、 5 または 6 個の N - グリコシル化部位を有する、配列番号： 1 0 7 に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸 3 6 から 4 5 0、 4 5 1、 4 5 2、 4 5 3、 4 5 4、 4 5 5、 4 5 6、 4 5 7、 4 5 8、 4 5 9、 4 6 0、 4 6 1、 4 6 2、 4 6 3、 4 6 4、 4 6 5、 4 6 6、 4 6 7、 4 6 8、 4 6 9、 4 7 0、 4 7 1、 4 7 2、 4 7 3、 4 7 4、 4 7 5、 4 7 6、 4 7 7、 4 7 8、 4 7 9、 4 8 0、 4 8 1、 4 8 2、 4 8 3、 4 8 4、 4 8 5、 4 8 6、 4 8 7、 4 8 8、 4 8 9、 4 9 0、 4 9 1、 4 9 2、 4 9 3、 4 9 4、 4 9 5、 4 9 6、 4 9 7、 4 9 8、 4 9 9、 5 0 0、 5 0 1、 5 0 2、 5 0 3、 5 0 4、 5 0 5、 5 0 6 または 5 0 7、 または、それらの対立遺伝子または種変異体における対応する位置を含む成熟 C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドである。

20

30

40

【 0 1 4 9 】

表 2 は、グリコシル化または部分的に脱グリコシル化され得る典型的な C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドの非限定的な例を提供する。以下の表 2 において、前駆体お

50

よび成熟体ポリペプチドの長さ（アミノ酸において）ならびにC - 末端を短縮されたPH 20タンパク質の前駆体および成熟体ポリペプチドの典型的なアミノ酸配列が示されている配列識別子（配列番号）が提供される。野生型PH 20ポリペプチドも、比較のために表2に含まれている。

表2 . 典型的なC - 末端を短縮されたPH 20ポリペプチド

【表2】

ポリペプチド	前駆体 (アミノ酸)	前駆体 配列番号	成熟体 (アミノ酸)	成熟体 配列番号
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-ISSV	506	45	471	97
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-LIIS	504	46	469	98
SPAM1-FLII	503	5	468	57
SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-MFIV	496	50	461	102
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-ATMF	494	51	459	103
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-LSAT	492	52	457	104
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-SPST	488	53	453	105
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-NASP	486	54	451	106
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69
SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71

10

20

30

40

【表 3】

SPAM1-EPQI	480	20	445	72
SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76
SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83
SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-GDVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

10

20

【 0 1 5 0 】

本明細書において提供される N - グリコシル化された、および部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、可溶性である、すなわち Triton (登録商標) X - 114 溶液の水相へ分配するもの、および不溶性である、すなわち Triton (登録商標) X - 114 溶液の界面活性剤相へ分配するものを含む。本明細書において提供される部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼ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。あるいは、部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、グリコシル化されていない、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166 および N254 に対応する 1、2 または 3 個の N - グリコシル化部位を有し得る。最小限、グリコシル化されている、1 つの N - グリコシル化部位は、少なくとも 1 つの N - アセチルグルコサミン部分を含む。

30

40

【 0 1 5 1 】

いくつかの例において、本明細書において提供される部分的に N - グリコシル化された C - 末端を短縮されたポリペプチドは可溶性であり、すなわち、GPI に固定されていない。これは、例えば、以下および実施例 4 に記載される、PI - PLC または PI - PLD とのインキュベーション後の Triton (登録商標) X - 114 アッセイを使用して、評価することができる。例えば、配列番号：107 に記載されている PH20 ポリペプチドのアミノ酸残基位置 490 に対応するアミノ酸位置とそれから 5' が C - 末端短縮されている PH20 ポリペプチドは、一般的に、哺乳動物発現系において発現されるとき、

50

可溶性である（例えば、実施例 3 参照）。これらのポリペプチドは、GPI アンカー結合シグナル配列を完全に欠いている事実のため可溶性である。他の例において、本明細書において提供される部分的にグリコシル化された C - 末端を短縮されたポリペプチドは不溶性であり、哺乳動物発現系において発現されるとき膜結合している。例えば、配列番号：107 に記載されている PH20 ポリペプチドのアミノ酸位置 500 に対応するアミノ酸位置とそれから 3' C - 末端短縮されている PH20 ポリペプチドは、一般的に、哺乳動物発現系において発現されるとき、不溶性である（例えば、実施例 3 参照）。本明細書において提供される C - 末端短縮ポリペプチドは、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166、N235、N254、N368 および N393 に対応する 3、4、5 または 6 個の N - グリコシル化部位がグリコシル化されるように、部分的にグリコシル化され得る。

10

【0152】

本明細書において提供される可溶性の部分的にグリコシル化された C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、短縮されているが GPI アンカー結合シグナルに位置する少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基を維持しているもの、および GPI アンカー結合シグナル配列および - 部位を完全に欠いているものを含む。したがって、ER におけるタンパク質の C - 末端に共有結合している GPI アンカーを有する、および細胞膜の細胞外膜に固定されている代わりに、これらのポリペプチドは分泌される。これらの C - 末端を短縮された可溶性 PH20 ポリペプチドは、3、4、5 または 6 個の N - グリコシル化部位がグリコシル化されるように部分的にグリコシル化され得る。典型的な GPI アンカー結合シグナル配列を欠いている可溶性の C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、何らかの種由来のもの、例えば、配列番号：107 - 109、111 - 120、197 および 198 のいずれかに記載されているもの、またはそれらの対立遺伝子変異体もしくは他の変異体である。これらの部分的にグリコシル化された可溶性の C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、配列番号：107 に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸 1 から 450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、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、498、499 または 500 を含むポリペプチドを生産するように C - 末端切断を有する。哺乳動物細胞における発現後の N - 末端シグナル配列が開裂されると、成熟型の部分的にグリコシル化された可溶性の C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、配列番号：107 に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸 36 から 450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、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、498、499 または 500 を含む。いくつかの例において、C - 末端 GPI アンカーシグナル配列を短縮された可溶性 PH20 ポリペプチドは、例えば、配列番号：107 のアミノ酸 N82、N166、N235、N254、N368 および N393 に対応する 3、4、5 または 6 個の N - グリコシル化部位で少なくとも 1 つの N - アセチルグルコサミンを含んで部分的にグリコシル化される。他の例において、C - 末端 GPI アンカーシグナル配列を短縮された可溶性 PH20 ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼのグリコシル化のレベルの 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% または 80% を有する。

20

30

40

【0153】

本明細書において提供される GPI アンカー結合シグナル配列における少なくとも 1 個のアミノ酸を維持する部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された PH20 ポリペプチドは、部分的に脱グリコシル化された延長された可溶性 PH20 ポリペプチドである。いくつかの例において、部分的に脱グリコシル化された C - 末端を短縮された PH2

50

0 ポリペプチドは、配列番号：107のアミノ酸N82、N166およびN254に対応する1、2または3個のN-グリコシル化部位でグリコシル化されていない。これらの部分的に脱グリコシル化された延長された可溶性PH20ポリペプチドは、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸1から491、492、493、494、495、496、497、498、499または500を含む。哺乳動物細胞において発現されるとき、35個のアミノ酸のN-末端シグナル配列はプロセッシング中に開裂され、タンパク質の成熟形態を分泌する。したがって、部分的に脱グリコシル化されたesPH20ポリペプチドの成熟形態は、配列番号：107に記載されているアミノ酸配列のアミノ酸36から491、492、493、494、495、496、497、498、499または500を含む。本明細書において提供される部分的にグリコシル化されたesPH20ポリペプチドの成熟ヒト形態は、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN-グリコシル化部位で少なくとも1個のN-アセチルグルコサミンを含む配列番号：59-63または100-104に記載されているものを含む。いくつかの例において、グリコシル化の程度は、エンドグリコシダーゼでの処理により減少する。したがって、本明細書において提供されるGPIアンカー結合シグナル配列において少なくとも1個のアミノ酸を含む部分的に脱グリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼ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。

【0154】

また、本明細書において提供されるものは、可溶性でなく、すなわち、細胞膜に結合され、したがって発現時に培地に分泌されない、部分的に脱グリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドである。可溶性でないC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、ヒアルロニダーゼ活性を維持している限り、部分的に脱グリコシル化され得る。典型的な可溶性でない部分的にグリコシル化された成熟型のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、配列番号：107のアミノ酸位置36から501、502、503、504、505、506または507に対応するアミノ酸を含むものである。したがって、本明細書において提供される可溶性でない部分的にグリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、完全にグリコシル化されたヒアルロニダーゼのグリコシル化のレベルの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%を維持する、466、467、468、469、470、471または472アミノ酸長であるもの、例えば、配列番号：55-58および97-99に記載されているものを含む。いくつかの例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する3、4、5または6個のN-グリコシル化部位がグリコシル化される。他の例において、配列番号：107のアミノ酸N82、N166、N235、N254、N368およびN393に対応する1、2、3、4、5または6個のN-グリコシル化部位は、少なくとも1つのN-アセチルグルコサミン部分を含む。

【0155】

本明細書において提供される部分的にグリコシル化されたC-末端を短縮されたポリペプチドは、PH20の野生型のGPIに固定された形態と比較して、増加または減少しているヒアルロニダーゼ活性を示し得る。さらに、部分的に脱グリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは中性活性である、すなわち、それらは中性pHでヒアルロニダーゼ活性を維持している。例えば、本明細書において提供されるC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態により示されるヒアルロニダーゼ活性の1%、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し得る。いくつかの例において、部分的にグリコシル化されたC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドは、野生型のGPIに固定された形態と比較して、ヒアルロ

10

20

30

40

50

ニダーゼ活性の増加を示す。

【 0 1 5 6 】

本明細書において提供される C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、また、N - グリコシル化され得る。本明細書において提供される N - グリコシル化されたおよび部分的に N - グリコシル化されたヒアルロニダーゼは、また、ハイブリッド、融合およびキメラの N - グリコシル化されたおよび部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼならびに N - グリコシル化されたおよび部分的に脱グリコシル化されたヒアルロニダーゼ複合体を含む。

【 0 1 5 7 】

3 . さらなる修飾

本明細書に含まれる P H 2 0 ポリペプチド、例えば、ヒト e s P H 2 0 ポリペプチド、N - グリコシル化されたおよび部分的に N - グリコシル化された C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドならびに部分的にグリコシル化された P H 2 0 ポリペプチドは、また、化学または翻訳後修飾を含むものおよび化学または翻訳後修飾を含まないものを含む。このような修飾は、ペグ化、シアル化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化および当該分野で知られている他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。したがって、本明細書において提供される C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチド、例えば、e s P H 2 0 ポリペプチドは、炭水化物部分、ポリエチレングリコール (P E G) 部分、シリル化部分、免疫グロブリン G 由来の F c ドメイン、または任意の他のドメインもしくは部分を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドの一次配列において、または該一次配列にはない他の修飾を含むことができる。例えば、このようなさらなる修飾は、タンパク質の安定性または血清半減期を増加させることができる。本明細書において提供される C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチド、例えば、e s P H 2 0 ポリペプチドは、化学および組換え方法を含む当該分野で知られている任意の方法を使用して、任意の部分と複合体化または融合させることができる (ただし、得られるポリペプチドはヒアルロニダーゼ活性を維持する)。

【 0 1 5 8 】

減少した免疫原性

本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチド、例えば、ヒト e s P H 2 0 ポリペプチドは、減少した免疫原性を有するように作ることができる。減少した免疫原性は、ポリペプチド由来の抗原エピトープを除去する配列交換により、または翻訳後修飾を変化することによりもたらすことができる。例えば、ポリペプチドが、最小限、配列番号 : 1 0 7 のアミノ酸残基 N 2 3 5、N 3 6 8 および N 3 9 3 で少なくとも N - アセチルグルコサミンを含む限り、ペプチドのグリコシル化の変化が考えられる。

【 0 1 5 9 】

例えば、P H 2 0 ポリペプチドは、フコース、特にピフコシル化を欠くように修飾され得る。特に、本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチドは、ピフコシル化されない。これは、ピフコシル化をもたらさない宿主細胞、一般的に昆虫宿主細胞において P H 2 0 ポリペプチドを発現し、生産することにより達成することができる。フコースは、多種多様の生物、例えば、哺乳動物、昆虫および植物に存在するデオキシヘキソースである。フコシル化されたグリカンは、フコシルトランスフェラーゼにより合成される。例えば、Ma et al., *Glycobiology*, 15(2):158R-184R, (2006); Nakayama et al., *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); および Sturla et al., *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005) 参照。ヒトにおいて、フコースは、頻りにグリカン構造に末端修飾として存在し、フコース 1, 6 - 連結 N - アセチルグルコサミンの存在は、糖タンパク質プロセッシングおよび認識において重要であることが示されている。昆虫において、N - グリカン核構造は、1, 6 - および 1, 3 - 連結でピフコシル化を示す。1, 3 - 連結での昆虫細胞核フコシル化は、ヒトにおいて免疫原性である炭水化物エピトープを生産する (例えば、米国特許出願第 2 0 0 7 0 0 6 7 8 5 5 号参照)。例えば、本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチド、例えば、e s P H 2 0 ポリペプチドは、ポリペプチドをピフコ

10

20

30

40

50

シル化することができない宿主細胞において生産することができる。したがって、ピフコシル化する昆虫細胞または他の細胞をポリペプチドの発現のために使用することができるが、一般的に哺乳動物細胞、例えば、CHO細胞を使用する。

【0160】

いくつかの例において、脱フコシル化された、またはフコース欠損のPH20ポリペプチドは、真核オリゴ糖プロセッシング遺伝子を含むバキュロウイルス発現ベクターの使用を介して、それにより「哺乳動物化」昆虫細胞発現系を創造する、修飾されたグリコシル化経路を有する昆虫細胞において生産することができる（例えば、米国特許第6,461,863号参照）。あるいは、1,3-フコシルトランスフェラーゼ（FT3）を欠いている昆虫細胞におけるPH20ポリペプチドの発現により、抗原性を除去することができる（例えば、米国特許出願第20070067855号参照）。他の例において、脱フコシル化された、またはフコース欠損のPH20ポリペプチドは、例えば、脱フコシル化されたタンパク質を生産する細胞系、例えば、タンパク質フコシル化を欠いているLec13 CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許出願第2003/0157108号；およびWO2004/056312）、およびノックアウト細胞系、例えば、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞（Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)）において生産することができる。

10

【0161】

ポリマーへの複合体化

いくつかの例において、本明細書において提供されるesPH20ポリペプチドおよび他のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチド、例えば、部分的にグリコシル化されたPH20ポリペプチドは、ポリマーと複合体化し得る。PH20ポリペプチドと複合体化することができる典型的なポリマーは、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つ以上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を含む。適当なポリマー分子の例は、ポリアルキレンオキシド（PAO）、例えば、ポリアルキレングリコール（PAG）、例えば、ポリエチレングリコール（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、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-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、デキストラン、例えば、カルボキシメチル-デキストラン、ヘパリン、相同アルブミン、セルロース、例えば、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、キトサンの加水分解物、デンプン、例えば、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、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、キサンタンゴム、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸加水分解物およびバイオポリマーから選択されるポリマー分子を含む。

20

30

40

【0162】

一般的に、ポリマーは、多糖類、例えば、デキストラン、プルランなどと比較して、架橋することができる反応基をほとんど有さない、ポリアルキレンオキシド（PAO）、例えば、ポリエチレンオキシド、例えば、PEG、一般的にmPEGである。一般的に、ポリマーは、比較的簡単な化学を使用して、esPH20ポリペプチドおよび他のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドに（例えば、タンパク質表面上の結合基に）共有結合することができる非毒性ポリマー分子、例えば、（メトキシ）ポリエチレングリコール（mPEG）である。

【0163】

50

e s P H 2 0 ポリペプチドおよび他の C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドへの結合のための適当なポリマー分子は、ポリエチレングリコール (P E G) および P E G 誘導体、例えば、メトキシ - ポリエチレングリコール (m P E G)、P E G - グリシジルエーテル (E p o x - P E G)、P E G - オキシカルボニルイミダゾール (C D I - P E G)、分岐 P E G およびポリエチレンオキシド (P E O) を含むが、これらに限定されない (例えば、Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris and Zalipsky (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 and Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; および Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004、参照)。ポリマー分子は、一般的に、約 3 k D a から約 6 0 k D a の範囲の分子量であり得る。いくつかの態様において、本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチドと複合体化しているポリマー分子は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 または 6 0 k D a を超える分子量を有する。

【 0 1 6 4 】

P E G または P E G 誘導体を共有結合する (複合体化する) ことによりポリペプチドを修飾する種々の方法 (すなわち「ペグ化」) は、当該分野で知られている (例えば、U . S . 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8、U . S . 5 , 6 7 2 , 6 6 2、U . S . 6 , 7 3 7 , 5 0 5 および U . S . 2 0 0 4 / 0 2 3 5 7 3 4、参照)。ペグ化のための技術は、特殊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)、単一の複合体部位への複数の P E G 部分の結合 (例えば、分岐 P E G の使用を介する、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) を含むが、これらに限定されない (また、例えば、Lu and Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu and Felix (1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix et al. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu et al. (1995) *J Immunol.* 154:3088-95 参照; また、Caliceti et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 および Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S 参照)。当該分野で記載されている方法および技術は、単一の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 を越える P E G または P E G 誘導体を有するタンパク質を生産することができる (例えば、U . S . 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8、参照)。

【 0 1 6 5 】

ペグ化のための多数の試薬が当該分野で記載されている。このような試薬は、N - ヒドロキシスクシンイミジル (N H S) 活性化 P E G、スクシンイミジル m P E G、m P E G 2 - N - ヒドロキシスクシンイミド、m P E G スクシンイミジルアルファ - メチルブタノエート、m P E G スクシンイミジルプロピオネート、m P E G スクシンイミジルブタノエート、m P E G 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 (homobifunctional) P E G - スクシンイミジルプロピオネート、ホモ二官能性 P E G プロピオンアルデヒド、ホモ二官能性 P E G ブチルアルデヒド、P E G マレイミド、P E G ヒドラジド、p - ニトロフェニル - カルボネート P E G、m P E G - 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 P E G、m P E G ブトリアルデヒド (butryaldehyde)、分岐 m P E G 2 ブチルアルデヒド、m P E G アセチル、m P E G ピペリドン、m P E G メチルケトン、m P E G 「リンカーなし」マレイミド、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 ピオチン P E G - N H S を含むが、これらに限定されない (例えば、Monfardini et al., *Bio*

10

20

30

40

50

conjugate 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; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; およびWO 0187925、参照)。

【0166】

他の修飾

本明細書において提供される e s P H 2 0 ポリペプチドおよび他の C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、また、それらの融合体および複合体を含む。

【0167】

E . 延長された可溶性 P H 2 0 および他の可溶性 P H 2 0 ヒアルロニダーゼをコードする核酸ならびにそれらのポリペプチドを生産する方法

本明細書に記載されている延長された可溶性 P H 2 0 、 C - 末端を短縮された P H 2 0 ヒアルロニダーゼおよび部分的にグリコシル化された P H 2 0 ヒアルロニダーゼのポリペプチドならびにこのようなポリペプチドをコードする核酸分子は、組換えタンパク質発現およびタンパク質精製のための当該分野でよく知られている方法により得ることができる。例えば、DNA は、所望の細胞から精製された、クローン化 DNA から (例えば、DNA ライブラリーから)、化学合成、cDNA クローニングまたはゲノム DNA またはそのフラグメントのクローニングにより得ることができる。ポリペプチドが組換え手段により生産されるとき、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知られているあらゆる手段を使用することができる。当該分野で利用できる任意の方法を、例えば、細胞または組織供給源から所望の P H 2 0 酵素をコードする全長 (すなわち、全コード領域を含む) cDNA またはゲノム DNA を得るために使用することができる。例えば、本明細書において提供される短縮された形態を含む修飾体または変異体は、標準組換え DNA 方法を使用して野生型ポリペプチドから操作することができる。

【0168】

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該分野で知られている利用できる任意の方法を使用して、クローニングまたは単離することができる。このような方法は、核酸の P C R 増幅およびライブラリーのスクリーニング、例えば、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含む。

【0169】

核酸の増幅のための方法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 方法は、所望のポリペプチドをコードする核酸分子を単離するために使用することができる。P C R は、当

10

20

30

40

50

該分野で知られている任意の方法または手段を使用して実施することができる。典型的なこのような方法は、Perkin-Elmer CetusサーマルサイクラーおよびTaqポリメラーゼ(Gene Amp)の使用を含む。核酸含有物質を、所望のポリペプチドをコードする核酸分子を単離することができる出発物質として使用することができる。例えば、DNAおよびmRNA調製物、細胞抽出物、適当な供給源(例えば、精巢、前立腺、乳房)由来の組織抽出物、液体サンプル(例えば、血液、血清、唾液)、健常および/または罹患対象由来のサンプルを、増幅方法において使用することができる。供給源は、真核種由来のあらゆるものであり得、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、鳥類、ウマ、イヌおよび他の霊長類供給源を含むが、これらに限定されない。核酸ライブラリーは、また、出発物質の供給源として使用することができる。プライマーは、所望のポリペプチドを増幅するように設計することができる。例えば、プライマーは、所望のポリペプチドが生産される発現される配列に基づいて設計することができる。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することができる。所望により、縮退プライマーを増幅のために使用することができる。所望の配列の3'および5'末端で配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを、核酸サンプルから配列をPCRにより増幅するためにプライマーとして使用することができる。プライマーを、本明細書において提供される全長PH20、またはその短縮配列、例えば、可溶性PH20ポリペプチドのいずれかをコードする核酸を増幅するために使用することができる。増幅により生産される核酸分子は、シーケンシングし、所望のポリペプチドをコードすることを確認することができる。

10

20

【0170】

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をコードする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目的のために、制限エンドヌクレアーゼ部位を含むリンカー配列を含む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に結合させることができる。さらに、機能的DNAエレメントを規定するさらなるヌクレオチド配列を、ポリペプチドをコードする核酸分子に作動可能に連結することができる。このような配列の例は、細胞内タンパク質発現を促進するように設計されたプロモーター配列、およびタンパク質分泌を容易にするように設計された分泌配列、例えば、異種シグナル配列を含むが、これらに限定されない。このような配列は、当業者に知られている。例えば、典型的な異種シグナル配列は、配列番号：144および145にそれぞれ記載されているヒトおよびマウスカッパIgG異種シグナル配列を含むが、これらに限定されない。さらなるヌクレオチド残基配列、例えば、タンパク質結合領域を規定する塩基の配列も、また、酵素をコードする核酸分子に連結させることができる。このような領域は、特定の標的細胞への酵素の取り込みを容易にするか、あるいは、合成遺伝子の産物の薬物動態学を変えるタンパク質を容易にするか、またはコードする残基の配列を含むが、これらに限定されない。

30

【0171】

加えて、例えば、ポリペプチドの検出またはアフィニティー精製を助けるために、タグまたは他の部分を加えることができる。例えば、さらなるヌクレオチド残基配列、例えば、エピトプタグまたは他の検出可能なマーカを規定する塩基の配列も、また、酵素をコードする核酸分子に連結することができる。典型的なこのような配列は、Hisタグ(例えば、6×His、HHHHHH;配列番号：142)またはFlaタグ(DYKDDDDK;配列番号：143)をコードする核酸配列を含む。

40

【0172】

次に、同定され、単離された核酸を、適当なクローニングベクターに挿入することができる。当該分野で知られている多くのベクター宿主系を使用することができる。可能なベクターは、プラスミドまたは修飾されたウイルスを含み、これらに限定されないが、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は、バクテリオファージ、例えば、ラムダ誘導體、またはプラスミド、例えば、pCMV4、pBR322またはpUCプラスミド誘導體またはBluescriptベクター(Strat

50

agene、La Jolla、CA)を含むが、これらに限定されない。他の発現ベクターは、本明細書に例示されるHZ24発現ベクター(配列番号:140に記載されている)を含む。クローニングベクターへの挿入は、例えば、DNAフラグメントを相補的な付着末端を有するクローニングベクターにライゲートすることにより達成することができる。DNAをフラグメントにするために使用される相補的な制限酵素認識部位がクローニングベクターに存在しないとき、DNA分子の末端を、酵素的に修飾することができる。あるいは、所望の任意の部位は、DNA末端に核酸配列(リンカー)をライゲートすることにより生産することができる。これらのライゲートされるリンカーは、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むことができる。代替方法において、開裂されたベクターおよびタンパク質遺伝子は、ホモポリマー

10

【0173】

組換え分子は、遺伝子配列の多数のコピーが生産されるように、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を介して、宿主細胞に導入することができる。特定の態様において、単離されたタンパク質遺伝子、cDNAまたは合成DNA配列を組み込む組換えDNA分子での宿主細胞の形質転換は、遺伝子の多数のコピーの生産を可能にする。したがって、形質転換体を増殖させ、形質転換体から組換えDNA分子を単離し、必要なとき、単離された組換えDNAから挿入された

20

【0174】

組換え生産に加えて、可溶性PH20、例えば、本明細書において提供される任意のesPH20は、固相技術(例えば、Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc., 85:2149-2154、参照)を使用する直接ペプチド合成により生産することができる。インビトロタンパク質合成は、手動法を使用して、または自動化により行うことができる。自動合成は、例えば、製造業者により提供される指示書にしたがって、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City CA)を使用することにより、達成することができる。ポリペプチドの種々のフラグメントを化学的に別々に合成し、化学方法を使用して組み合

30

【0175】

1. ベクターおよび細胞

本明細書に記載されているいずれかのような1つ以上の所望のタンパク質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む核酸を、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むベクターに挿入することができる。必要な転写および翻訳シグナルは、また、PH20遺伝子の天然プロモーターおよび/またはその隣接領域により提供することができる。

【0176】

また、酵素をコードする核酸を含むベクターを提供する。ベクターを含む細胞も提供する。細胞は真核および原核細胞を含み、ベクターはその使用のために任意の適したものである。

40

【0177】

ベクターを含む、内皮細胞を含む原核および真核細胞を提供する。このような細胞は、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を含む。細胞は、コードされたタンパク質が細胞により発現される条件下で上記細胞を増殖させ、発現されたタンパク質を回収することにより、それらのタンパク質を生産するために使用される。本明細書における目的のために、例えば、延長された可溶性PH20ポリペプチドを含む可溶性PH20ポリペプチドは、培地に分泌され得る。

50

【 0 1 7 8 】

宿主細胞株を、挿入された配列の発現を調節するか、または所望の様式において発現されたタンパク質を処理する能力について選択することができる。このようなポリペプチドの修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化を含むが、これらに限定されない。翻訳後プロセッシングは、ポリペプチドのフォールディングおよび/または機能に影響し得る。異なる宿主細胞、例えば、限定しないが CHO (DG44、DXB11、CHO-K1)、HeLa、MCDK、293およびWI38は、特異的な細胞機構およびこのような翻訳後活性のための特性メカニズムを有し、導入されるタンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択することができる。一般的に、細胞の選択は、発現されるポリペプチドにN結合型グリコシル化を導入することができるものである。したがって、該ベクターを含む真核細胞を提供する。典型的な真核細胞は、哺乳動物チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である。例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠失 CHO 細胞 (例えば、DG44 細胞) を、本明細書において提供されるポリペプチドを生産するために使用する。本明細書において提供される延長された可溶性 PH20 または C-末端を短縮された PH20 の細菌発現は、触媒的に活性なポリペプチドをもたらさないが、適当なグリコシル化機構と組み合わせられたとき、PH20 は人工的にグリコシル化され得ることに注意する。

10

【 0 1 7 9 】

天然または異種シグナル配列と結合している、延長された可溶性 PH20 ポリペプチドおよび他の C-末端を短縮された PH20 ポリペプチドを含む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、ならびにそれらの多数のコピーを含むベクターを提供する。ベクターは、細胞における酵素タンパク質の発現のために、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することができる。

20

【 0 1 8 0 】

種々の宿主-ベクター系が、タンパク質コード配列を発現させるために使用することができる。これらは、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他のウイルス) に感染した哺乳動物細胞系、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、微生物、例えば、酵母ベクターを含む酵母、または、バクテリオファージ、DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA で形質転換された細菌を含むが、これらに限定されない。ベクターの発現エレメントは、強度および特異性を変化する。使用される宿主-ベクター系に依存して、多くの適当な転写および翻訳エレメントの任意の1つを使用することができる。

30

【 0 1 8 1 】

適当な転写/翻訳調節シグナルおよびタンパク質コード配列を含むキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築するために、ベクターへの DNA フラグメントの挿入のための当業者に知られている任意の方法を使用することができる。これらの方法は、インビトロ組換え DNA および合成技術およびインビボ組換え (遺伝子組換え) を含むことができる。タンパク質、またはそのドメイン、誘導體、フラグメントもしくは相同体をコードする核酸配列の発現は、遺伝子またはそのフラグメントが組換え DNA 分子で形質転換された宿主において発現されるように、第2の核酸配列により調節することができる。例えば、タンパク質の発現は、当該分野で知られている任意のプロモーター/エンハンサーにより調節することができる。特定の態様において、プロモーターは所望のタンパク質に対する遺伝子由来のものではない。使用することができるプロモーターは、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' 末端反復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))、原核生物の発現ベクター、例えば、b-ラクタマーゼプロモーター (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

40

50

242:79-94 (1980)中の“Useful Proteins from Recombinant Bacteria”も参照)、ノパリン合成プロモーターを含む植物発現ベクター(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ソームリシ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))、酵母および他の真菌由来のプロモーターエレメント、例えば、Gal4プロモーター、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いる以下の動物の転写調節領域、膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼI遺伝子調節領域(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))、膵臓ベータ細胞において活性であるインスリン遺伝子調節領域(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調節領域(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、リンパ球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調節領域(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調節領域(Pinckert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987))、肝臓において活性であるアルファ-フェトプロテイン遺伝子調節領域(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アルファ-1アンチトリプシン遺伝子調節領域(Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987))、骨髄細胞において活性であるベータグロビン遺伝子調節領域(Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986))、脳の乏突起膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域(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遺伝子調節領域(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調節領域(Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986))を含むが、これらに限定されない。

【0182】

特定の態様において、PH20タンパク質、またはそのドメイン、フラグメント、誘導体または相同体をコードする核酸、1つ以上の複製起点、および、所望により、1つ以上の選択可能なマーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)に作動可能に連結したプロモーターを含むベクターを使用する。発現系に依存して、特異的な開始シグナルも、PH20配列の効率的な翻訳のために必要である。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。PH20またはその可溶性形態の開始コドンおよび上流配列が適当な発現ベクターに挿入される場合、さらなる翻訳調節シグナルを必要としない。コード配列またはその部分のみを挿入する場合、ATG開始コドンを含む外因性転写調節シグナルを提供しなければならない。さらに、開始コドンは全挿入物の転写を確実にするように正しいリーディングフレーム内でなければならない。外因性転写エレメントおよび開始コドンは、天然および合成両方の種々の起源であり得る。発現の効率は、使用する細胞系に適当なエンハンサーの包含により増強することができる(Scharf et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bittner et al. (1987) Methods in Enzymol, 153:516-544)。

【0183】

典型的な大腸菌細胞の形質転換のためのプラスミドベクターは、例えば、pQE発現ベクター(Qiagen, Valencia, CAから利用できる;系を記載しているQiagenにより発表された文献も参照)を含む。pQEベクターは、ファージT5プロモーター(大腸菌RNAポリメラーゼにより認識される)およびしっかりと調節された、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)、6x

H i s タグコード配列、 t_0 および T 1 転写ターミネーター、C o l E 1 複製起点、ならびにアンピシリン耐性を与えるためのベータ-ラクタマーゼ遺伝子を有する。p Q E ベクターは、組換えタンパク質の N - または C 末端のいずれかで 6 x H i s タグの配置が可能である。このようなプラスミドは、全 3 つのリーディングフレームに関するマルチクロニングサイトを提供し、N - 末端に 6 x H i s タグのタンパク質の発現を提供する、p Q E 3 2、p Q E 3 0 および p Q E 3 1 を含む。他の大腸菌細胞の形質転換のための典型的なプラスミドベクターは、例えば、p E T 発現ベクター（米国特許 4, 9 5 2, 4 9 6 参照、NOVAGEN、Madison、WI から利用できる、系を記載している Novagen により発表された文献も参照）を含む。このようなプラスミドは、T 7 l a c プロモーター、T 7 ターミネーター、誘導性大腸菌 l a c オペレーターおよび l a c リプレッサー遺伝子を含む p E T 1 1 a、T 7 プロモーター、T 7 ターミネーターおよび大腸菌 o m p T 分泌シグナルを含む p E T 1 2 a - c、ならびに H i s カラムでの精製において使用するための H i s - T a g^{T M} リーダー配列およびカラムを介した精製後の切断を可能にする トロンピン開裂部位、T 7 - l a c プロモーター領域および T 7 ターミネーターを含む p E T 1 5 b および p E T 1 9 b (NOVAGEN、Madison、WI) を含む。

10

【 0 1 8 4 】

典型的な哺乳動物細胞発現のためのベクターは、H Z 2 4 発現ベクターである。H Z 2 4 発現ベクターは、p C I ベクター骨格由来であった (Promega)。それは、ベータ-ラクタマーゼ耐性遺伝子 (AmpR)、F 1 複製起点、サイトメガロウイルス前初期エンハンサー/プロモーター領域 (CMV)、および SV 4 0 後期ポリアデニル化シグナル (SV 4 0) をコードする DNA を含む。発現ベクターは、また、E C M V ウイルス (Clontech) 由来の内部リボソーム侵入部位 (IRES) およびマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を有する。このようなベクターでトランスフェクトされた細胞を、ヒポキサンチンおよびチミジンの非存在下で化学的に定義された培地で培養し、次にメトトレキサートの増加した濃度でさらに遺伝子増幅を行うことができる。このような方法は、実施例 1 3 および 1 5 において本明細書に記載されている。

20

【 0 1 8 5 】

2 . 発現

本明細書において提供される P H 2 0 ポリペプチド、例えば、e s P H 2 0 ポリペプチドおよび C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、インビボおよびインビトロ方法を含む当業者に知られている任意の方法により生産することができる。所望のタンパク質は、例えば、投与および処置のために必要とされるタンパク質の必要量および形態を生産するために適当な任意の生物において発現させることができる。発現宿主は、原核生物および真核生物、例えば、大腸菌、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞系を含む哺乳動物細胞およびトランスジェニック動物を含む。発現宿主は、それらのタンパク質生産レベルならびに発現されたタンパク質に存在する翻訳後修飾の型において異なり得る。発現宿主の選択は、これらのものおよび他の因子、例えば、法的安全性考察、生産コストならびに精製のために必要なものおよび精製のための方法に基づいて行うことができる。

30

【 0 1 8 6 】

多数の発現ベクターが利用でき、当業者に知られており、タンパク質の発現のために使用することができる。発現ベクターの選択は、宿主発現系の選択により影響する。一般的に、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を含むことができる。安定な形質転換のために使用される発現ベクターは、一般的に、形質転換細胞の選択および維持を可能にする選択可能なマーカーを有する。いくつかの場合において、複製起点は、ベクターのコピー数を増幅するために使用することができる。

40

【 0 1 8 7 】

可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチド、例えば、e s P H 2 0 および他の C - 末端を短縮された P H 2 0 ポリペプチドは、また、タンパク質融合物として利用するか、または発

50

現させることができる。例えば、酵素融合物を、酵素にさらなる機能性を加えるために産生することができる。酵素融合タンパク質の例は、シグナル配列、局在のためなどのタグ、例えば、*his*₆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、タンパク質分泌および/または膜結合に指向するための配列ならびに半減期を延長するために使用される他の配列の融合物、例えば、Fc融合物を含む。

【0188】

組換えタンパク質の長期の高収率生産のために、安定な発現が望まれる。例えば、可溶性PH20、例えば、*esPH20*または別のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドを安定に発現する細胞系を、ウイルス複製起点または内因性発現エレメントおよび選択可能なマーカー遺伝子を含む発現ベクターを使用して形質転換することができる。ベクターの導入後、細胞を富化培地中で1-2日間増殖させ、それらを選択培地に移すことができる。選択可能なマーカーの目的は選択に対する耐性を与え、その存在が導入された配列を成功裏に発現する細胞の増殖および回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性細胞を、細胞型に適切な組織培養技術を使用して急増させることができる。

【0189】

種々の選択系を形質転換された細胞系を回収するために使用することができる。これらは、TK-またはAPRT-細胞のそれぞれにおいて使用することができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler M et al. (1977) Cell, 11:223-32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy I et al. (1980) Cell, 22:817-23) 遺伝子を含むが、これらに限定されない。また、代謝拮抗物質、抗生物質または除草剤耐性を、選択のための基礎として使用することができる。例えば、メトトレキサートに対する耐性を与えるDHFR (Wigler M et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, 77:3567-70); アミノグリコシド ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与えるnpt (Colbere-Garapin F et al. (1981) J. Mol. Biol., 150:1-14); およびクロロスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼのそれぞれに対する耐性を与えるalsまたはpatを使用することができる。さらなる選択可能な遺伝子、例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにするtrpBまたは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノール (histinol) を利用できるようにするhisDが記載されている (Hartman SC and RC Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci, 85:8047-51)。アントシアニン、ベータグルクロニダーゼおよびその基質GUSならびにルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンを含むが、これらに限定されない可視マーカーも、また、形質転換体を同定するために、また、特定のベクター系に起因する一過性の、または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用することができる (Rhodes CA et al. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131)。

【0190】

可溶性PH20ポリペプチド、例えば、*esPH20*、および他のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドの存在および発現をモニタリングすることができる。例えば、機能性ポリペプチドの検出は、適当な条件下でヒアルロニダーゼ酵素活性のための馴化培地で試験することにより測定することができる。以下のセクションGは、発現されたタンパク質の溶解度および活性を評価するための典型的なアッセイを提供する。

【0191】

a. 原核細胞

原核生物、とりわけ大腸菌は、多量のタンパク質を生産するための系を提供する。大腸菌の形質転換は、当業者によく知られている簡単かつ迅速な技術である。大腸菌のための発現ベクターは、誘導プロモーターを含むことができ、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ために、宿主細胞にいくらかの毒性を示すタンパク質を発現させるために有用である。誘導プロモーターの例は、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プロモーターならびに温度調節 PLプロモーターを含む。

【0192】

例えば、本明細書において提供されるもののようなタンパク質は、大腸菌の細胞質環境中で発現させることができる。細胞質は還元環境であり、いくつかの分子に関して、これは不溶性封入体の形成をもたらすことができる。還元剤、例えば、ジチオトレイトールおよび β -メルカプトエタノールならびに変性剤、例えば、グアニジン-HCl およびウレアは、タンパク質を再可溶性にするために使用することができる。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生産をもたらすことができる、細菌のペリプラズム空間におけるタンパク質の発現である。一般的に、タンパク質をペリプラズムに指向するリーダー配列を、発現されるタンパク質と融合させる。次に、リーダーは、ペリプラズム内のシグナルペプチダーゼにより除去される。ペリプラズム標的リーダー配列の例は、ペクチン酸リアーゼ遺伝子由来の p e l B 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を含む。いくつかの場合において、ペリプラズム発現は、培養培地への発現されたタンパク質の流出を可能にする。タンパク質の分泌物は、培養上清から迅速かつ簡単な精製が可能である。分泌されないタンパク質は、浸透圧溶解によりペリプラズムから得ることができる。細胞質発現と同様に、タンパク質が不溶性になる場合において、再可溶化およびリフォールディングを容易にするために、変性剤および還元剤を使用することができる。誘導および増殖の温度は、また、発現レベルおよび溶解度に影響し得、一般的に 25 から 37 の温度を使用する。一般的に、細菌はグリコシル化タンパク質を生産する。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とき、宿主細胞から精製後に、グリコシル化をインビトロで加えることができる。

10

20

【 0 1 9 3 】

b . 酵母細胞

酵母、例えば、出芽酵母、分裂酵母、アルカン資化酵母、キラー酵母およびメタノール資化酵母は、本明細書に記載されているもののようなタンパク質の生産のために使用することができるよく知られている酵母発現宿主である。酵母は、エピソーム複製ベクターで、または相同組換えによる安定な染色体組込みにより形質転換することができる。一般的に、誘導プロモーターを、遺伝子発現を調節するために使用する。このようなプロモーターの例は、G A L 1、G A L 7 および G A L 5 ならびにメタロチオネインプロモーター、例えば、C U P 1、A O X 1 または他のピチア属または他の酵母のプロモーターを含む。発現ベクターは、しばしば、形質転換された DNA の選択および維持のために選択可能なマーカー、例えば、L E U 2、T R P 1、H I S 3 および U R A 3 を含む。酵母において発現されるタンパク質は、しばしば、可溶性である。シャペロニン、例えば、B i p およびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼの共発現は、発現レベルおよび溶解度を改良することができる。さらに、酵母において発現されるタンパク質は、分泌シグナルペプチド融合物、例えば、出芽酵母由来の酵母接合型アルファ因子分泌シグナル、および酵母細胞表面タンパク質、例えば、A g a 2 p 接合型接着受容体またはアークスラ・アデニニボランス (*Arxula adenivorans*) グルコアミラーゼとの融合物を使用して、分泌を指向することができる。例えば、K e x - 2 プロテアーゼに関するプロテアーゼ開裂部位を操作して、分泌経路から出るとき、発現されるポリペプチドから融合配列を除去することができる。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することが可能である。

30

40

【 0 1 9 4 】

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、ポリペプチド、例えば、ヒアルロニダーゼポリペプチドを発現するために有用である。昆虫細胞は、高レベルのタンパク質を発現し、高等真核生物により使用されるほとんどの翻訳後修飾が可能である。バキュロウイルスは、安全性を改善し、真核細胞の発現の規制懸念を減少させる限定的な宿主範囲を有する。典型的な発現ベクターは、高レベル発現のためのプロモーター、例えば、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターを使用する。一般的に使用されるバキュロウイルス系は、バキュロウイルス、例えば、キンウワバ核多角体病ウイルス (A c N P V) お

50

よびカイコガ核多角体病ウイルス (B m N P V) ならびに昆虫細胞系、例えば、ヨトウガ、夜蛾の幼虫 (A 7 S) およびオオカバマダラ (D p N 1) 由来の S f 9 を含む。高レベル発現のため、発現される分子のヌクレオチド配列は、ウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合される。哺乳動物分泌シグナルは、昆虫細胞において正確にプロセッシングされ、培養培地に発現されたタンパク質を分泌するために使用することができる。加えて、細胞系、夜蛾の幼虫 (A 7 S) およびオオカバマダラ (D p N 1) は、哺乳動物細胞系と同様のグリコシル化パターンでタンパク質を生産する。典型的な昆虫細胞は、免疫原性を減少させるために改変されているもの、例えば、「哺乳動物化」バキュロウイルス発現ベクターを有するものおよび酵素 F T 3 を欠いているものである。

【 0 1 9 5 】

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。細胞系、例えば、S c h n i e d e r 2 (S 2) および K c 細胞 (キイロショウジョウバエ) および C 7 細胞 (ヒトスジシマカ) は、発現のために使用することができる。ショウジョウバエメタロチオネインプロモーターは、カドミウムまたは銅での重金属誘導の存在下で高レベルの発現を誘導するために使用することができる。発現ベクターは、一般的に、選択可能なマーカー、例えば、ネオマイシンおよびハイグロマイシンの使用により維持される。

【 0 1 9 6 】

d . 哺乳動物細胞

哺乳動物発現系は、可溶性ヒアルロニダーゼポリペプチドを含むタンパク質を発現させるために使用することができる。発現構築物は、ウイルス感染、例えば、アデノウイルスにより、または直接 D N A 導入、例えば、リポソーム、リン酸カルシウム、D E A E - デキストランにより、および物理的方法、例えば、エレクトロポレーションおよび微量注入により、哺乳動物細胞に移すことができる。哺乳動物細胞のための発現ベクターは、一般的に、m R N A キャップ部位、T A T A ボックス、翻訳開始配列 (K o z a k 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。I R E S エレメントは、また、別の遺伝子、例えば、選択可能なマーカーと共に、ニシストロン性発現を可能にするために加えることができる。このようなベクターは、しばしば、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、S V 4 0 プロモーター - エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス (R S V) の長末端反復を含む。これらのプロモーター - エンハンサーは、多数の細胞型において活性である。組織および細胞型プロモーターおよびエンハンサー領域は、また、発現のために使用することができる。典型的なプロモーター / エンハンサー領域は、エラストラーゼ 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、アルファフェトプロテイン、アルファ 1 アンチトリプシン、ベータグロビン、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のような遺伝子に由来するものを含むが、これらに限定されない。選択可能なマーカーは、発現構築物を有する細胞を選択および維持するために使用することができる。選択可能なマーカー遺伝子の例は、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 (D H F R) およびチミジンキナーゼを含むが、これらに限定されない。例えば、発現は、D H F R 遺伝子を発現する細胞のみを選択するために、メトトレキサートの存在下で実施することができる。細胞表面シグナル伝達分子、例えば、T C R - および F c R I - との融合物は、細胞表面上で活性状態のタンパク質の発現を指向することができる。

【 0 1 9 7 】

多数の細胞系を、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含む哺乳動物発現のために利用することができる。典型的な細胞系は、C H O、B a l b / 3 T 3、H e L a、M T 2、マウス N S 0 (非分泌) および他の骨髄腫細胞系、ハイブリドーマおよびヘテロハイブリドーマ細胞系、リンパ球、繊維芽細胞、S p 2 / 0、C O S、N I H 3 T 3、H E K 2 9 3、2 9 3 S、2 B 8 および H K B 細胞を含むが、これらに限

10

20

30

40

50

定されない。細胞系は、また、細胞培養培地から分泌されるタンパク質の精製を容易にする血清非含有培地に適用されるものを利用することができる。例えば、CHO-S細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) および血清非含有EBNA-1細胞系 (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.) を含む。細胞系は、また、最大発現のために最適化された特別な培地において増殖するように適用されたものを利用することができる。例えば、DG44 CHO細胞は、化学的に定義された動物産物非含有培地中で懸濁培養において増殖するように適用されている。

【0198】

e. 植物

トランスジェニック植物細胞および植物は、本明細書に記載されているもののようなタンパク質を発現させるために使用することができる。発現構築物は、一般的に、直接DNA導入、例えば、微粒子銃およびプロトプラストへのPEG介在導入、およびアグロバクテリウム介在形質転換を使用し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調節エレメントを含むことができる。発現ベクターおよび形質転換技術は、通常、双子葉植物宿主、例えば、シロイヌナズナおよびタバコ、ならびに単子葉植物宿主、例えば、トウモロコシおよびイネに分けられる。発現のために使用される植物プロモーターの例は、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、リボースニリン酸カルボキシラーゼプロモーターならびにユビキチンおよびUBQ3プロモーターを含む。選択可能なマーカー、例えば、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が、しばしば、形質転換細胞の選択および維持を容易にするために使用される。形質転換された植物細胞は、細胞凝集体 (カルス組織) として培養物中で維持することができるか、または植物全体に再生することができる。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生産するように操作された藻類を含むことができる。植物は哺乳動物細胞と異なるグリコシル化パターンを有するため、これらの宿主において生産されるタンパク質の選択に影響し得る。

【0199】

3. 精製技術

可溶性PH20、例えば、esPH20および他のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培養からコードされたタンパク質の発現および回収に適切な条件下で培養することができる。組換え細胞により生産されるタンパク質は、一般的に分泌されるが、使用される配列および/またはベクターに依存して細胞内に含まれ得る。当業者により理解されるとおり、PH20をコードする核酸を含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通るPH20の直接分泌を容易にするシグナル配列を考慮して設計することができる。

【0200】

したがって、宿主細胞からのポリペプチドの精製のための方法は、選択された宿主細胞および発現系に依存する。分泌される分子に関して、タンパク質は、一般的に、細胞を除去後に培養培地から精製される。細胞内発現に関して、細胞を溶解し、タンパク質を抽出物から精製することができる。トランスジェニック生物、例えば、トランスジェニック植物および動物が発現のために使用されるとき、組織または臓器を出発物質として使用して、溶解した細胞抽出物を作ることができる。さらに、トランスジェニック動物生産は、回収することができるミルクまたは卵におけるポリペプチドの生産を含むことができ、必要なとき、該タンパク質を抽出し、当該分野で標準の方法を使用してさらに精製することができる。

【0201】

可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20ポリペプチドまたは他のC-末端を短縮されたPH20ポリペプチドのようなタンパク質は、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ならびに陰イオン交換のようなイオン交換クロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない当該分野で知られ

10

20

30

40

50

ている標準タンパク質精製技術を使用して、精製することができる。アフィニティー精製技術も、また、調製物の効率および純度を改良するために利用することができる。例えば、PH20ヒアルロニダーゼ酵素に結合する抗体、受容体および他の分子を、アフィニティー精製において使用することができる。例えば、可溶性PH20を、条件培地から精製することができる。

【0202】

発現構築物は、また、タンパク質、例えば、mycエピトープ、GST融合物またはHis₆を付加するように加工し、それぞれmyc抗体、グルタチオン樹脂およびNi樹脂とアフィニティー精製することができる。このようなタグは、本明細書において他に記載のない限り、可溶性PH20をコードするヌクレオチド配列と結合させることができ、これは可溶性タンパク質の精製を容易にすることができる。例えば、可溶性PH20は、タンパク質精製を容易にするために加えられる1つ以上のさらなるポリペプチドドメインを有する組換えタンパク質として発現させることができる。このような精製を容易にするドメインは、固定化金属における精製を可能にする金属キレートペプチド、例えば、ヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリンにおける精製を可能にするタンパク質AドメインおよびFLAG伸長/アフィニティー精製系(Immunex Corp., Seattle Wash.)において利用されるドメインを含むが、これらに限定されない。精製ドメインと発現されるPH20ポリペプチド間の開裂可能なリンカー配列、例えば、因子XAまたはエンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego, CA)を含むことは、精製を容易にするために有用である。1つのこのような発現ベクターは、可溶性PH20を含む融合タンパク質の発現のために提供し、6ヒスチジン残基をコードする核酸、次にチオレドキシニンおよびエンテロキナーゼ開裂部位を含む。ヒスチジン残基はIMIAc(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)における精製を容易にするが、エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からポリペプチドを精製するための手段を提供する。

【0203】

純度は、ゲル電気泳動、直交HPLC方法、染色および分光光度法を含む当該分野で知られている任意の方法により評価することができる。発現され、精製されたタンパク質は、当業者に知られている任意のアッセイまたは方法、例えば、セクションGに記載されている任意のものを使用して、分析することができる。これらは、ゲル電気泳動による分析、免疫測定法およびヒアルロニダーゼ活性のアッセイを含むが、これらに限定されない、タンパク質の物理的および/または機能特性に基づくアッセイを含む。

【0204】

使用される発現系および宿主細胞に依存して、得られるポリペプチドは、生産および精製時に培養培地中に存在するペプチダーゼによって異種であり得る。例えば、CHO細胞における可溶性PH20の培養は、異種ポリペプチドの混合物をもたらす得る。可溶性PH20(例えば、rHuPH20)の産生、生産および精製のための典型的なプロトコールは、以下の実施例13-15に記載されている。同様に、例えば、配列番号:60に記載されているアミノ酸配列36-497を有するポリペプチドをコードする核酸の発現は、可変的に497、496、495、494、493、492、491、490、489で終える、またはより短いポリペプチドを含むポリペプチドの異種混合物をもたらす得る。

【0205】

F. 延長された可溶性PH20ポリペプチドおよび他の可溶性PH20ポリペプチドの製造、製剤化および投与

可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20の医薬組成物は、投与用で本明細書において提供される。可溶性PH20ポリペプチドは、別々に製剤化することができ、また、例えば、セクションGにおいて記載されている他の治療剤の医薬製剤と共に製剤化または投与することができる。化合物は、適当な医薬品、例えば、経口投与のために、溶液、懸濁液、錠剤、分散性錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤またはエリキシル剤、ならびに経皮パッチ製剤および乾燥粉末吸入剤に製剤化することができる。一般的に

10

20

30

40

50

、化合物は、当該分野でよく知られている技術および手段を使用して、医薬組成物に製剤化される（例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126、参照）。

【0206】

一般的に、治療有効用量が考慮される。疾患または状態の処置のために投与される選択された可溶性PH20の量は、標準臨床技術により決定することができる。加えて、インビトロアッセイおよび動物モデルは、最適な用量範囲を同定するのに助けるために使用することができる。正確な用量は、経験的に決定することができ、特定の酵素、投与経路、処置される疾患の型および疾患の重症度に依存し得る。

【0207】

したがって、正確な用量および処置期間は、処置される疾患の関数であり、既知の試験プロトコールを使用して経験的に、またはインビボもしくはインビトロ試験データからの外挿によって決定できると理解される。濃度および用量の値は、また、緩和される状態の重症度で変化し得ることに注意すべきである。任意の特定の対象に対して、特定の投与レジメンは、個々の必要性および組成物を投与するか、または組成物の投与を管理する人の専門的な判断にしたがって時間をかけて調整されるべきであること、および本明細書に記載されている濃度は、単に典型であり、組成物およびそれを含む組合せの範囲または使用を限定する意図はないことをさらに理解すべきである。組成物は、毎時間、毎日、毎週、毎月、毎年または1回投与され得る。一般的に、投与レジメンは、毒性を制限するように選択される。担当医が毒性、または骨髄、肝臓もしくは腎臓または他の組織機能障害によって用量を低下させるために、治療をどのように、いつ、終結、中断または調整するかを知っていることに注意すべきである。逆に、担当医は、また、臨床反応が不相当であるとき（毒性副作用を除く）、処置を、どのように、いつ、より高いレベル調整するかを知っている。

【0208】

薬学的に許容される組成物は、動物およびヒトにおける使用のための一般的に認識される薬局方にしたがって、監督官庁または他の官庁の承認を考慮して製造される。組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末および持続放出製剤の形態をとることができる。組成物は、従来の結合剤および担体、例えば、トリグリセリドと、坐薬として製剤化することができる。経口製剤は、標準担体、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン酸ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムおよび他のこのような薬剤を含むことができる。製剤は投与経路に適合するべきである。

【0209】

医薬組成物は、可溶性PH20が投与される担体、例えば、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを含むことができる。適当な医薬担体の例は、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、一般的に、精製された形態における治療有効量の化合物を、患者への適当な投与のための形態を提供するような適当な量の担体と共に含む。このような医薬担体は、滅菌液体、例えば、水および油、例えば、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツオイル、ダイズ油、鉱油およびゴマ油であり得る。医薬組成物が静脈内に投与されるとき、水は典型的な担体である。塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液を、また、特に注射可能な溶液のために、液体担体として使用することができる。組成物は、活性成分と共に、希釈剤、例えば、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、滑剤、例えば、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、ならびに結合剤、例えば、デンプン、天然ゴム、例えば、アカシアゴム、ゼラチン、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン、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知られている他のこのような結合剤を含むことができる。適当な医薬賦形剤は、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

10

20

30

40

50

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を含む。組成物は、また、所望により、少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、トリエタノールアミン、酢酸ナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミンおよび他のこのような薬剤を含むことができる。

【0210】

薬学的に治療的に活性化化合物およびその誘導体の製剤は、ヒトおよび動物への投与のために、単位投与形態または複数回投与形態で提供される。例えば、化合物は、適当な量の化合物またはその薬学的に許容される誘導体を含む、錠剤、カプセル、丸剤、粉末、顆粒、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、および水中油型エマルジョンとして製剤化することができる。それぞれの単位投与形態は、必要とされる医薬担体、ビヒクルまたは希釈剤と共に、所望の治療効果を生産するために十分な予め決められた量の治療活性化化合物を含む。単位投与形態の例は、アンプルおよびシリンジならびに個々にパッケージされた錠剤またはカプセルを含む。単位投与形態は、画分またはその複数のもので投与することができる。複数回投与形態は、分離された単位投与形態において投与される、単一の容器にパッケージされた複数の同一の単位投与形態である。複数回投与形態の例は、バイアル、錠剤もしくはカプセルのボトルまたはポイントもしくはガロンのボトルを含む。したがって、複数回投与形態は、パッケージング中で分離されていない、複数の単位投与形態である。一般的に、非毒性担体から作られる平衡で0.005%から100%の範囲における活性成分を含む投与形態または組成物を、製造することができる。

【0211】

一般的に本明細書において提供される組成物は、皮下経路による投与のために製剤化されるが、他の投与経路、例えば、当業者に知られている任意の経路、例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮内、病巣内、腹腔内注射、硬膜外、腔、経直腸、局所、耳、経皮投与または任意の経路も考慮される。このような経路に適当な製剤は当業者に知られている。投与は、治療の部位に依存して局所(local)、局所(topical)または全身であり得る。処置を必要とする領域への局所投与は、例えば、限定はしないが、手術の際の局所注入、例えば、術後の創傷被覆材と併用した局所適用、注射、カテーテル、坐薬またはインプラントにより達成することができる。組成物は、また、他の生物学的に活性な剤と共に、連続して、断続的に、また同じ組成物中のいずれかで投与することができる。

【0212】

任意の場合において最も適当な経路は、種々の因子、例えば、疾患の性質、特定の投与経路に対する対象の耐容性、疾患の重症度および使用される特定の組成物に依存する。一般的に、本明細書において提供される組成物は、非経腸的に投与される。いくつかの例において、可溶性pH2.0組成物は皮膚または組織の間質に達するように投与され、それにより次の治療剤の送達のための間質腔を分解する。したがって、いくつかの例において、皮膚下への、例えば、皮下投与方法による直接投与が考慮される。したがって、1つの例において、局所投与は、注射により、例えば、シリンジまたは注射デバイス、例えば、針を含む他の製品から達成することができる。他の例において、局所投与は、ポンプまたは他の類似のデバイスの使用により容易にされ得る注入により達成することができる。他の投与様式も考慮される。医薬組成物は、それぞれの投与経路に適当な投与形態で製剤化することができる。

【0213】

投与方法は、分解プロセス、例えば、タンパク質分解ならびに抗原および免疫原性応答を介する免疫学的介入への選択された可溶性pH2.0ポリペプチドの暴露を減少させるために使用することができる。このような方法の例は、処置部位での局所投与を含む。治療薬のペグ化は、タンパク質分解に対する抵抗性を増加させ、血漿半減期を増加させ、抗原性および免疫原性を減少させることが報告されている。ペグ化方法論の例は、当該分野で知られている(例えば、Lu and Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1

994; 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; Bru meanu et al., J Immunol., 154: 3088-95, 1995; see also, Caliceti et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10):1261-77およびMolineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2):3S-8S、参照)。ペグ化は、また、インビボでの核酸分子の送達において使用することができる。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加させることができる(例えば、Cheng et al. (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51、参照)。

【 0 2 1 4 】

1. 注射可能物質、溶液およびエマルジョン

一般的に皮下に、筋肉内に、静脈内に、または皮内にのいずれかでの注射または注入により特徴付けられる非経口投与が、本明細書において考えられる。注射可能物質は、液体溶液または懸濁液、注射前に液体中の溶液または懸濁液用の適当な固体形態、またはエマルジョンのいずれかとして慣用の形態で製造することができる。適当な賦形剤は、例えば、水、塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールである。医薬組成物は、他の少量の非毒性補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度エンハンサー、および他のこのような薬剤、例えば、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、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を含み得る。一定レベルの用量が維持されるような徐放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えられる。このような非経口組成物に含まれる活性化合物のパーセントは、その特定の性質、ならびに化合物の活性および対象の必要性に高度に依存する。

【 0 2 1 5 】

注射可能物質は、局所および全身投与用に設計される。本明細書における目的のために、局所投与は、罹患している間質への直接投与が望ましい。非経口投与のための調製物は、注射用滅菌溶液、皮下錠剤を含む使用直前に溶媒と組み合わせられる用の滅菌乾燥可溶性生成物、例えば、凍結乾燥粉末、注射用滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルと組み合わせられる用の滅菌乾燥不溶性生成物および滅菌エマルジョンを含む。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とき、適当な担体は、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、および増粘および可溶化剤、例えば、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を含む溶液ならびにそれらの混合物を含む。

【 0 2 1 6 】

非経口調製物において使用される薬学的に許容される担体は、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、バッファー、抗酸化剤、局所麻酔剤、懸濁および分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖またはキレート化剤および他の薬学的に許容される物質を含む。水性ビヒクルの例は、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、デキストロースおよび乳酸加リンガー液を含む。非水性非経口ビヒクルは、植物起源の固定油、綿実油、コーンオイル、ゴマ油およびピーナッツオイルを含む。静菌または静真菌濃度の抗菌剤を、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を含む、複数回投与容器にパッケージングされた非経口調製物に加えることができる。等張剤は、塩化ナトリウムおよびデキストロースを含む。バッファーは、リン酸およびクエン酸を含む。抗酸化剤は、重硫酸ナトリウムを含む。局所麻酔剤は、塩酸プロカインを含む。懸濁および分散剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンを含む。乳化剤は、ポリソルベート80(TWEEN80)を含む。金属イオンの金属イオン封鎖またはキレート化剤は、EDTAを含む。医薬担体は、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ポリ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を含む。

【 0 2 1 7 】

薬学的に活性な化合物の濃度は、注射または注入が、所望の薬理学的効果、例えば、血糖コントロールを生じるために有効量を提供するように調整される。正確な用量は、当該分野で知られているとおり、患者または動物の年齢、体重および状態に依存する。単位用量非経口調製物は、例えば、アンプル、カートリッジ、バイアルまたは針を備えたシリンジ中にパッケージされ得る。薬学的に活性な化合物を含む液体溶液または再構成された粉末調製物の容量は、処置される疾患とパッケージのために選択される特定の製品の相関関係である。非経口投与のためのすべての調製物は、当該分野で知られ、実施されているように滅菌されなければならない。

【0218】

1つの例において、医薬品は、液体形態、例えば、溶液、シロップまたは懸濁液であり得る。液体形態において提供されるとき、医薬品は、使用前に治療有効濃度に希釈される濃縮調製物として提供され得る。このような液体調製物は、薬学的に許容される添加物、例えば、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體または硬化食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステルまたは分画植物油）；および防腐剤（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）を使用して、慣用の手段により製造することができる。他の例において、医薬品は、使用前に水または他の適当なビヒクルで再構成するための凍結乾燥形態で存在することができる。

10

【0219】

凍結乾燥粉末

本明細書において興味あるものは凍結乾燥粉末であり、これは、溶液、エマルジョンおよび他の混合物として投与のために再構成することができる。それらは、また、固体またはゲルとしても再構成され、製剤化され得る。

20

【0220】

滅菌凍結乾燥粉末は、不活性な酵素の化合物をバッファー溶液に溶解することにより製造される。バッファー溶液は、粉末または粉末から製造された再構成された溶液の安定性または他の薬理学的要素を改善する賦形剤を含み得る。次に溶液の滅菌濾過、次に当業者に知られている標準条件下での凍結乾燥により、所望の製剤を提供する。簡潔には、凍結乾燥粉末は、賦形剤、例えば、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロースまたは他の適当な薬剤を、適当なバッファー、例えば、クエン酸、リン酸ナトリウムもしくはカリウムまたは当業者に知られている他のこのようなバッファーに溶解することにより製造される。次に、選択された酵素を得られた混合物に加え、溶解するまで攪拌する。得られた混合物を、微粒子を除去し、無菌性を確実にするために滅菌濾過または処理し、凍結乾燥のためのバイアルに分配する。それぞれのバイアルは、化合物の単回用量または複数回用量を含む。凍結乾燥粉末は、適当な条件下、例えば、約4 から室温で保存することができる。適当なバッファー溶液でのこの凍結乾燥粉末の再構成により、非経口投与における使用のための製剤を提供する。

30

【0221】

2. 局所投与

局所混合物は、局所および全身投与に関して記載されているとおりに製造される。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、エリキシル剤、ローション、懸濁液、チンキ剤、ペースト、泡状物、エアロゾル、洗浄剤、噴霧剤、坐薬、包帯、皮膚パッチまたは局所投与のために適当な他のあらゆる剤形として製剤化される。

40

【0222】

化合物またはその薬学的に許容される誘導體は、例えば、吸入による局所適用のためのエアロゾルとして製剤化され得る（例えば、米国特許第4,044,126,4,414,209および4,364,923号参照、これらは炎症性疾患、特に喘息の処置のために有用なステロイドの送達のためのエアロゾルを記載している）。呼吸管への投与のため

50

のこれらの製剤は、単独または不活性担体、例えば、ラクトースと組み合わせて、噴霧器のためのエアロゾルまたは溶液の形態中で、または吸入のための超微粒粉末としてであり得る。このような場合において、製剤の粒子は、一般的に、50ミクロン未満または10ミクロン未満の直径を有する。

【0223】

化合物は、ゲル、クリームおよびローションの形態で、局所適用、例えば、皮膚および、例えば、眼における粘膜への局所適用、および眼への適用または嚢内もしくは髄腔内適用のために製剤化することができる。局所投与は、経皮送達用、また、眼または粘膜への投与用、または吸入治療用に考慮される。活性化合物の経鼻溶液は、また、単独または他の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて、投与することができる。

10

【0224】

経皮投与に適切な製剤を提供する。それらは、任意の適当な形式、例えば、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に適合された個別のパッチで提供することができる。このようなパッチは、例えば、活性化合物に対して0.1から0.2Mの濃度の所望により緩衝された水溶液中に活性化合物を含む。経皮投与に適切な製剤は、また、イオン導入により送達することができ(例えば、Pharmaceutical Research 3(6):318 (1986)、参照)、一般的に所望により活性化合物の緩衝された水溶液の形態をとる。

【0225】

3. 他の投与経路のための組成物

処置される状態に依存して、他の投与経路、例えば、局所適用、経皮パッチ、経口および経直腸投与も、本明細書において考えられる。例えば、経直腸投与用の医薬投与形態は、全身効果のための経直腸坐薬、カプセルおよび錠剤である。経直腸坐薬は、体温で融解または軟化し、1種以上の薬理的または治療活性成分を放出する、直腸への挿入のための固形物を含む。経直腸坐薬において利用される薬学的に許容される物質は、融点を上げるための基剤またはビヒクルおよび薬物である。基剤の例は、ココアバター(カカオ油)、グリセリン-ゼラチン、カルボワックス(ポリオキシエチレングリコール)ならびに脂肪酸のモノ、ジおよびトリグリセリドの適当な混合物を含む。種々の基剤の組合せが使用され得る。坐薬の融点を上げるための薬物は鯨ろうおよびワックスを含む。経直腸坐薬は、圧縮法または鑄造のいずれかにより製造され得る。経直腸坐薬の典型的な重量は、約2から3gmである。経直腸投与用の錠剤およびカプセルは、同じ薬学的に許容される物質を使用して、経口投与用の製剤と同じ方法により製造される。

20

30

【0226】

経直腸投与に適切な製剤は、単位用量坐薬として提供され得る。これらは、活性化合物を1種以上の慣用の固体担体、例えば、ココアバターと混合し、次に得られた混合物を成形することにより製造することができる。

【0227】

経口投与のために、医薬組成物は、慣用の手段により、薬学的に許容される賦形剤、例えば、結合剤(例えば、プレゼラチン化メイズデンブ、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);増量剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム);滑剤(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、ポテトデンブまたはグリコール酸ナトリウムデンブ);または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)と製造される、例えば、錠剤またはカプセルの形態を取ることができる。錠剤は、当該分野でよく知られている方法によりコーティングすることができる。

40

【0228】

経口内(舌下)投与に適切な製剤は、例えば、風味付けされた基剤、通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカント中に活性化合物を含むドロップ、および不活性基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシア中に該化合物を含むトローチを含む。

【0229】

50

医薬組成物は、また、制御放出製剤および/または送達デバイスにより投与することができる(例えば、米国特許第3,536,809、3,598,123、3,630,200、3,845,770、3,847,770、3,916,899、4,008,719、4,687,610、4,769,027、5,059,595、5,073,543、5,120,548、5,354,566、5,591,767、5,639,476;5,674,533および5,733,566号、参照)。

【0230】

リポソームへのカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現することができる組換え細胞、受容体介在エンドサイトーシス、および選択された可溶性PH20ポリペプチドをコードする核酸分子の送達、例えば、レトロウイルス送達系を含むが、これらに限定されない種々の送達系が知られており、選択された可溶性PH20ポリペプチドを投与するために使用することができる。

10

【0231】

したがって、特定の態様において、リポソームおよび/またはナノ粒子は、また、可溶性PH20ポリペプチドの投与で使用することができる。リポソームは、水性媒体中に分散され、多重膜同心性二層小胞(multilamellar concentric bilayer vesicle)(多重膜小胞(multilamellar vesicles)(MLV)とも称される)を自発的に形成するリン脂質から形成される。MLVは、一般的に、25nmから4μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、コア中に水溶液を含む200から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 vesicle)(SUV)の形成をもたらす。

20

【0232】

リン脂質は、水中に分散されるとき、脂質対水のモル比に依存してリポソーム以外の種々の構造を形成し得る。低い比で、リポソームを形成する。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価の陽イオンの存在に依存する。リポソームは、イオン性および極性物質に対して低い透過性を示すが、高温で著しく透過性が変化する相転移を受け得る。相転移は、ゲル状態として知られているぎっしり詰まっており規則正しい構造から、流体状態として知られているゆるく充填された、あまり規則正しく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加をもたらす。

【0233】

リポソームは、異なるメカニズム、細網内皮系の食細胞、例えば、マクロファージおよび好中球によるエンドサイトーシス、非特異的な弱い疎水性もしくは静電気力、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、細胞膜へのリポソームの脂質二重層の挿入による細胞膜との融合と、リポソーム内容物の細胞質への同時放出、および、リポソーム内容物と何ら関連のない細胞またはオルガネラ膜へのリポソーム脂質の移動、またはその逆を介して細胞と相互作用する。種々のリポソーム製剤は、作動するメカニズムを変えることができ、1つ以上を同時に作動することができる。ナノカプセルは、一般的に、安定かつ再現性のある方法において化合物を封入することができる。細胞内ポリマー過負荷による副作用を回避するために、このような超微粒子(約0.1μmのサイズ)は、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの必要条件に合う生分解性ポリアルキル-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作ることができる。

30

40

【0234】

4. 用量および投与

本明細書において提供される可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20は、単回投与または複数回投与のための医薬組成物として製剤化することができる。選択されるヒアルロン分解酵素は、処置される患者に望ましくない副作用の非存在下で治療的に有用な効果を発揮するために十分な量で含まれる。治療的に有効な濃度は、既知のインビトロおよびインビボ系においてポリペプチドを試験することにより、例えば、本明細書において提供される、または当該分野で知られているアッセイを使用することにより、経験

50

的に決定し(例えば、Taliani et al. (1996) Anal. Biochem., 240: 60-67; Filocamo et al. (1997) J Virology, 71: 1417-1427; Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32: 9-18; Buffard et al. (1995) Virology, 209:52-59; Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem., 237: 239-244; Hamatake et al. (1996) Intervirology 39:249-258; Steinkuhler et al. (1998) Biochem., 37:8899-8905; D'Souza et al. (1995) J Gen. Virol., 76:1729-1736; Takeshita et al. (1997) Anal. Biochem., 247:242-246参照;また、例えば、Shimizu et al. (1994) J. Virol. 68:8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70:7219-7223; Mizutani et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 227:822-826; Lu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 93:1412-1417; Hahm et al., (1996) Virology, 226:318-326; Ito et al. (1996) J. Gen. Virol., 77:1043-1054; Mizutani et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., 212:906-911; Cho et al. (1997) J. Virol. Meth. 65:201-207参照)、次にそれからヒトに対する用量を推定することができる。

10

【0235】

一般的に、可溶性PH20酵素の治療有効用量は、安定化溶液または懸濁液または凍結乾燥形態中で、10ユニット(U)から500,000ユニット、100ユニットから100,000ユニット、500ユニットから50,000ユニット、1000ユニットから10,000ユニット、5000ユニットから7500ユニット、5000ユニットから50,000ユニット、または1,000ユニットから10,000ユニット、一般的に1,000から50,000ユニットであるか、またはほぼ前記のユニットである。製剤は、例えば、アンプル、シリンジおよび個々にパッケージされた錠剤またはカプセルを含むが、これらに限定されない単位用量形態で提供することができる。分散剤は、0.1-100ml、1-50ml、10-50ml、10-30ml、1-20ml、または1-10ml、一般的に10-50mlの全容量中で、単独または他の薬理的に有効な薬剤または治療剤と共に投与することができる。

20

【0236】

例えば、可溶性PH20、例えば、esPH20は、10U、20U、30U、40U、50U、100U、150U、200U、250U、300U、350U、400U、450U、500U、600U、700U、800U、900U、1000U、2,000U、3,000U、4,000ユニット、5,000Uまたはそれ以上であるか、またはほぼ前記のユニットで皮下に投与することができる。いくつかの例において、用量は、可溶性PH20 対 投与される治療剤の量の比率として提供することができる。例えば、可溶性PH20ポリペプチドは、1ヒアルロニダーゼU/治療剤U(1:1)から50:1またはそれ以上、例えば、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1またはそれ以上で、またはほぼ前記の比率で投与することができる。一般的に、本明細書において考えられる可溶性PH20の注射または注入の体積は、0.01ml、0.05ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml、10ml、20ml、30ml、40ml、50mlまたはそれ以上で、またはほぼ前記のmlである。可溶性PH20は、100U/ml、150U/ml、200U/ml、300U/ml、400U/ml、500U/ml、600U/ml、800U/mlまたは1000U/mlで、またはほぼ前記のU/mlで貯蔵溶液として提供でき、また直接的使用のため、または使用前に有効な濃度に希釈のための、さらなる濃縮形態、例えば、2000U/ml、3000ユニット/ml、4000U/ml、5000U/ml、8000U/ml、10,000U/mlまたは20,000U/mlで、またはほぼ前記のU/mlで提供できる。可溶性PH20は、液体または凍結乾燥製剤として提供することができる。

30

40

【0237】

5. パッケージング、製品およびキット

50

可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20またはこのようなポリペプチドをコードする核酸、それらの誘導體または変異体の医薬化合物は、パッケージング材料、疾患または障害を処置するために有効である医薬組成物、および可溶性PH20または核酸分子が疾患または障害を処置するために使用されることを示すラベルを含む製品としてパッケージされ得る。選択される可溶性PH20ヒアルロニダーゼまたはその誘導體または変異体および治療剤の組合せも、製品においてパッケージされ得る。

【0238】

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む。パッケージング医薬品における使用のためのパッケージング材料は、当業者によく知られている。例えば、米国特許第5,323,907、5,052,558および5,033,252号、参照、これらそれぞれをその全体において本明細書に包含させる。医薬パッケージング材料の例は、プリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ、ボトル、ならびに選択される製剤および意図される投与経路および処置に適当なあらゆるパッケージング材料を含むが、これらに限定されない。製品は、局所注射目的のために投与（例えば、表皮下投与）を容易にするように、針または他の注射デバイスを含むことができる。可溶性PH20、例えば、esPH20および特定の疾患または障害を処置することが知られている治療剤を含む、本明細書において提供される化合物および組成物の多様な製剤が考えられる。パッケージの選択は、可溶性PH20および/または治療剤、ならびにこのような組成物が一緒に、または別々にパッケージされるか否かに依存する。1つの例において、可溶性PH20は、治療剤との混合物としてパッケージされ得る。他の例において、該成分は別々の組成物としてパッケージされ得る。

【0239】

選択される可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20ポリペプチド、その治療剤および/または製品も、キットとして提供することができる。キットは、本明細書に記載されている医薬組成物および製品として提供される投与のための物を含むことができる。例えば、可溶性PH20ポリペプチドは、投与のためのデバイス、例えば、シリンジ、吸入器、用量カップ、点滴器またはアプリケーションターと提供することができる。組成物は、投与のための物に含まれていてもよく、または後で加えられるために別々に提供されてもよい。キットは、所望により、投与、投与レジメンを含む適用のための指示書および投与様式の指示書を含み得る。キットは、また、本明細書に記載されている医薬組成物および診断のための物を含むことができる。例えば、このようなキットは、対象における選択されたプロテアーゼの濃度、量または活性を測定するための物を含むことができる。

【0240】

G. アッセイ

本明細書において提供される可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20ポリペプチドは、可溶性であり、ヒアルロニダーゼ酵素活性を維持する。本明細書において提供されるN-グリコシル化された、または部分的にN-グリコシル化されたPH20ポリペプチドは、ヒアルロニダーゼ酵素活性を維持する。本明細書において提供されるPH20の活性は、C-末端短縮または部分的にN-グリコシル化されていない対応するPH20の活性と比較して、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上で、またはほぼ前記%である。可溶性PH20ヒアルロニダーゼポリペプチド、例えば、esPH20の活性は、当該分野でよく知られている方法を使用して評価することができる。これらの方法は、例えば、マイクロ濁度アッセイおよびビオチン化ヒアルロン酸を使用するマイクロタイターアッセイを含む。活性および評価は、馴化培地または上清または精製されたタンパク質で実施することができる。タンパク質の溶解度も、また、例えば、Triton（登録商標）X-114分配アッセイにより測定することができる。すべてのアッセイにおいて、可溶性PH20の活性または溶解度を対照、例えば、C-末端切断のない全長PH20と比較することができる。

【0241】

1. ヒアルロニダーゼ活性

可溶性PH20ポリペプチドの活性は、当該分野でよく知られている方法を使用して評価することができる。例えば、ヒアルロニダーゼに対するUSP XXIIアッセイは、酵素を30分37℃でHAと反応させた後に残存する非分解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り間接的に活性を測定する(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(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、ユニットにおける活性を確認するためのアッセイにおいて使用することができる。

【0242】

1つの例において、活性は、実施例12に記載されているマイクロ濁度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)と一定期間(例えば、10分)インキュベートし、次に未消化ヒアルロン酸ナトリウムを酸性血清アルブミンの添加で沈澱させることにより測定される。得られるサンプルの濁度は、さらなる発達期間の後に、640nmで測定される。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は、ヒアルロニダーゼ酵素活性の基準である。

【0243】

他の例において、ヒアルロニダーゼ活性は、ヒアルロニダーゼとのインキュベーション後に残存するビオチン化ヒアルロン酸を測定す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)。実施例4において、短縮されているヒトPH20ヒアルロニダーゼのヒアルロニダーゼ活性は、ビオチン化ヒアルロン酸を使用して測定される。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、ビオチン化ヒアルロン酸基質をマイクロタイタープレートと共有結合させる。ヒアルロニダーゼとのインキュベーション後、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、既知の活性のヒアルロニダーゼ標準との反応後に得られたものと比較する。基質がマイクロタイタープレートと共有結合しているとき、人工産物、例えば、ビオチン化基質のpH-依存移動が生じない。感度は、10%未満のアッセイ間変動で培養細胞および生物学的サンプルからヒアルロニダーゼ活性の迅速な測定を可能にする。

【0244】

ヒアルロニダーゼ活性を測定するための他のアッセイも当該分野で知られており、本明細書における方法において使用することができる(例えば、Delpech et al., (1995) Anal. Biochem. 229:35-41; Takahashi et al., (2003) Anal. Biochem. 322:257-263、参照)。

【0245】

多数のヒアルロニダーゼアッセイは、新規の還元N-アセチルアミノ基の生産(Bonner and Cantey, Clin. Chim. Acta 13:746-752, 1966)、または粘度(De Saiegui et al., Arch. Biochem. Biophys. 121:548-554, 1967)もしくは濁度の喪失(Dorfman and Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948)の測定に基づいている。精製された基質で、すべてのこれらの方法は、エンド型グルコサミド(endoglucosamidic)活性の存在または非存在の決定に十分である。

【0246】

実質的に精製されたグリコサミノグリカン基質も、また、ゲルシフトアッセイにおいて使用することができる。グリコサミノグリカン組換えPH20、例えば、可溶性PH20と混合し、ゲル内の基質移動度の変化をもたらすエンドグルコシダーゼ活性について試験する。典型的なこのような基質は、Sigma Chemicalから得ることができる、コンドロイチン-4および6硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸を含むが、これら

10

20

30

40

50

に限定されない。ヒト臍帯ヒアルロナンは、ICNから得ることができる。例えば、それぞれの試験基質は、pH 3.5 - 7.5のバッファー中で0.1 mg/mlに、またはほぼ前記mg/mlに希釈することができる。このような典型的なアッセイにおいて、PH 20を発現する細胞からの精製された可溶性PH 20または馴化培地の10 µlまたはほぼ前記のµlのサンプルを、所望のバッファー中の90 µlまたはほぼ前記のµlの試験基質と混合し、3時間37 °Cでインキュベートすることができる。インキュベーション後、サンプルをサンプルバッファー(Tris EDTA pH 8.0、プロモフェノールブルーおよびグリセロール)で中性にし、電気泳動に付す。グリコサミノグリカンは、当該分野で知られている任意の方法を使用して検出することができ、例えば、グリコサミノグリカンは、一晚、3%の氷酢酸中の0.5%のAlcian Blueを使用するゲルの染色、次に7%の氷酢酸における脱染色により検出することができる。分解は、酵素の存在または非存在における基質移動度の比較により決定される。

10

【0247】

ヒアルロニダーゼ活性は、また、基質ゲル酵素電気泳動により検出することができる(Guentenhoner et al., 1992, Matrix 388-396)。このアッセイにおいて、サンプルをヒアルロン酸を含むSDS-PAGEゲルに付し、サンプル中のタンパク質を電気泳動法により分離する。次にゲルを酵素アッセイバッファー中でインキュベートし、次にゲル中のヒアルロン酸を検出するために染色する。ヒアルロニダーゼ活性は、基質ゲルにおける除去されたゾーンとして視覚化される。

【0248】

20

可溶性PH 20ポリペプチドが展着剤または拡散剤として作用する能力も評価することができる。例えば、トリパンブルー色素を可溶性PH 20と共に、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注射することができる。次に、色素領域を、例えば、マイクロメーターカリパスを用いて、測定し、ヒアルロナン分解酵素が展着剤として作用する能力を決定する(米国特許第20060104968号)。ヒアルロニダーゼの他の薬剤、例えば、治療剤との共投与のその薬剤の薬物動態学および薬物動力学特性に対する効果も、例えば、臨床試験の設定において動物モデルおよび/またはヒト対象を使用してインビボで評価することができる。

【0249】

可溶性PH 20、例えば、esPH 20の機能活性は、これらの任意のアッセイを使用して参照標準と比較および/または標準化することができる。可溶性PH 20の機能的に同等な量を決定することができる。例えば、展着剤または拡散剤として作用する可溶性PH 20の能力は、マウスの側面の皮膚へトリパンブルーと共に注入することにより評価でき、例えば、100ユニットのヒアルロニダーゼ参照標準と同じ量の拡散を達成するために必要な量を決定することができる。したがって、必要な可溶性PH 20の量は、100ユニットのヒアルロニダーゼと機能的に同等な量である。

30

【0250】

2. 溶解度

ヒアルロニダーゼの溶解度は、当業者に知られている任意の方法により測定することができる。溶解度を測定するための1つの方法は、界面活性剤による分配である。例えば、可溶性PH 20ポリペプチドは、例えば、37 °CでのTriton(登録商標)X-114溶液の水相への分配により、識別することができる(Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-1607)。例えば、本明細書に記載されているPH 20ポリペプチドの溶解度は、実施例4に記載されているとおりに評価される。膜に固定されたヒアルロニダーゼ、例えば、脂質に固定されたヒアルロニダーゼ、例えば、GPIに固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。ホスホリパーゼCは、GPIに固定されたタンパク質において見出されるホスホ-グリセロール結合を開裂する酵素である。PLCでの処理は、細胞膜の外側からGPI連結タンパク質の放出を引き起こす。

40

【0251】

50

溶解度を評価するための別の方法は、PH20ポリペプチドがGPIに固定されているか、否かを測定することである。GPIに固定されたPH20ポリペプチドは、細胞膜に結合しており、したがって不溶性である。PH20ポリペプチドがGPIに固定されているか否かを測定するために、1つはPLC/PLD加水分解前後の溶解度を評価する、また、GPIアンカー結合シグナル配列を同定するための予測アルゴリズムを使用することができる。GPIに固定されたタンパク質は、界面活性剤分配（例えば、Triton（登録商標）X-114）、抗体認識および代謝放射性標識と共に、特異的な酵素的または化学的開裂後の可溶化により同定することができる。

【0252】

タンパク質がGPIアンカーを有することを証明するために使用される一般的な方法は、細菌PI-PLCまたはトリパノソーマ由来GPI-特異的ホスホリパーゼC（GPI-PLC）で処理することによる細胞表面からのその放出またはその可溶化である。これらの酵素は、膜におけるジアシルグリセロールを開裂し、タンパク質上に免疫反応性グリカンエピトープ（CRD）を生産し、これはトリパノソーマのGPIに対して生産された抗体でのウエスタンブロット法により検出することができる。とりわけ哺乳動物細胞において遭遇するこのアプローチでの1つの一般的な問題は、リパーゼはイノシトールがアシル化されているGPIアンカーを開裂することができないことである。これらは、弱アルカリでの処理前にイノシトール環上の脂肪酸を除去することが必要である。あるいは、血清由来GPI-特異的ホスホリパーゼDは、GPIアンカーを開裂するために使用することができる。この酵素はイノシトール環とホスファチジン酸部分間を開裂し、イノシトールアシル化により抑制されない。フッ化水素酸は、イノシトール環とホスファチジン酸間のGPIアンカーを開裂し、また、あらゆるホスホエタノールアミンとマンノシル残基間のホスホジエステル結合を開裂する。希亜硝酸は、非アセチル化グルコサミンとイノシトール環間を特異的に開裂し、タンパク質結合グリカン（今、診断的なアンヒドロマンノース部分を含む）およびホスファチジルイノシトールを放出するため、GPIアンカーの試験において特に有用である。CRD抗体、組成分析、myo-イノシトール、エタノールアミン、グルコサミン、マンノースまたは脂肪酸での放射性標識およびクロマトグラフまたは界面活性剤分配方法と組み合わせて、これらの分解方法は、タンパク質上のGPIアンカーを試験するための強力なツールセットを示す。

【0253】

ポリペプチドにおけるGPIアンカー結合シグナルコンセンサス配列を同定するために使用することができる種々のコンピューター方法およびアルゴリズムが、開発されている（例えば、Udenfriend et al. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:741-758, Kronegg and Buloz, (1999); "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser et al., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria et al., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni et al., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392参照); (バイオインフォマティクスウェブサイト、例えば、ExPASy Proteomics ツールサイト (expasy.ch/tools/) で容易に利用できるものを含む)。したがって、当業者は、PH20ポリペプチドがGPIアンカー結合シグナル配列を含むか否か、したがって、PH20ポリペプチドがGPIに固定されたタンパク質であるか否かを決定することができる。

【0254】

H. 延長された可溶性PH20および他の可溶性PH20の処置方法および使用ならびに併用療法

PH20ヒアルロニダーゼの種々の形態は、ヒトにおける治療的使用のために製造され、承認されている。例えば、動物由来ヒアルロニダーゼ調製物は、Vitrase（登録商標）（ISTA Pharmaceuticals）、精製された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を含む。Hylenex（登録商標）（Halozyme Therapeutics）は、可溶性rHuP

10

20

30

40

50

H20をコードする核酸を含む遺伝的に操作されたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞により生産されたヒト組換えヒアルロニダーゼである。ヒアルロニダーゼに対する承認された治療的使用は、皮下注入（皮下流体投与）のために他の治療剤の吸収および分散を増加させるためのアジュバントとしての、および放射線不透過性物質の吸収を改善するために皮下尿路造影における補助剤としての使用を含む。これらの適応に加えて、ヒアルロニダーゼは、さらなる疾患および状態の処置のための治療剤または化粧品として使用することができる。

【0255】

ヒアルロニダーゼは、また、化学療法活性および/または腫瘍の化学療法への接近可能性を増強するために使用されている（Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, abstract no. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45:H.9）。ヒアルロニダーゼとの組合せ化学療法は、膀胱癌（Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307）、扁平上皮癌腫（Kohno et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297）、乳癌（Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596）および消化器癌（Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8:391-396）を含む種々の癌の処置において有効である。ヒアルロニダーゼは、脳の癌（神経膠腫）の処置において単独の治療剤として有効である（PCT公開出願WO88/02261、1988年4月7日公開）。ヒアルロニダーゼの投与は、また、脾臓、胃、大腸、卵巣および乳房の従来の化学療法耐性腫瘍の応答性を誘導する（Baumgartner et al., 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al., 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390）。残念なことに、汚染物質および非ヒト性質のこのようなヒアルロニダーゼは、アナフィラキシー反応をもたらす。

【0256】

間接的な抗癌作用に加えて、ヒアルロニダーゼは、また、直接的な抗癌作用を有する。ヒアルロニダーゼは、マウスに移植された腫瘍の増殖を防止し（De Maeyer et al., 1992, Int. J. Cancer 51:657-660）、発癌物質への暴露時に腫瘍形成を抑制する（Pawlowski et al., 1979, Int. J. Cancer 23:105-109; Haberman et al., 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, abstract no. 415）。

【0257】

特に、PH20ヒアルロニダーゼは、高い間質液圧と関連するヒアルロナン関連疾患または状態、例えば、椎間板圧迫、増殖性疾患、例えば、癌および良性前立腺過形成、および浮腫を処置するために使用することができる。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。増殖性疾患は、癌、平滑筋細胞増殖、全身性硬化症、肝硬変症、成人呼吸窮迫症候群、特発性心筋症、エリテマトーデス、網膜症、例えば、糖尿病性網膜症または他の網膜症、心臓過形成、生殖器系関連障害、例えば、良性前立腺過形成（BPH）および卵巣嚢胞、肺線維症、子宮内膜症、線維腫症、良性腫瘍（hamatomas）、リンパ管腫症、サルコイドーシス、類腱腫を含むが、これらに限定されない。癌は、固形およびリンパ性/血液腫瘍および転移性疾患ならびに未分化腫瘍を含む。処置に適している腫瘍は、一般的に、同じ組織型の非癌性組織と比較して、または同じ腫瘍型の非転移性腫瘍と比較して、ヒアルロナンの細胞性および/または間質性発現を示す。癌は、任意の1つまたはそれ以上の卵巣癌、in situ癌腫（ISC）、扁平上皮癌腫（SCC）、前立腺癌、脾臓癌、他の胃癌、非小細胞性肺癌、乳癌、脳の癌および大腸癌を含む。

【0258】

したがって、PH20ヒアルロニダーゼは、展着剤としての使用を含み、それに加えて多数の使用を有する。ヒアルロニダーゼは、一般的に、例えば、眼科手術前の局所麻酔における球周囲の遮断のために使用される。酵素の存在は、さらなる遮断のための必要性を妨げ、アキネジア（眼球運動の喪失）の発症までの時間を速める。球周囲およびテノン嚢下の遮断は、眼科処置のためのヒアルロニダーゼの最も一般的な適用である。ヒアルロニ

10

20

30

40

50

ダーゼは、また、美容整形、例えば、眼瞼形成およびしわ取りにおけるアキネジアを促進し得る。本明細書において提供される可溶性PH20ヒアルロニダーゼ、例えば、esPH20ヒアルロニダーゼが、PH20ヒアルロニダーゼが使用されるあらゆる処置方法または併用療法において使用することができることが理解される（例えば、米国公開番号US20040268425；US20050260186；US20060104968；および米国出願番号第12/381,844、12/386,249、12/387,225および12/386,222号（これら全体を出典明示により包含させる）参照）。ヒアルロニダーゼに対する典型的な治療および化粧用途は、以下に記載されている。

【0259】

1. 展着剤および併用療法としての使用

上記のとおり、ヒアルロニダーゼは、結合組織および特定の特殊組織、例えば、臍帯および硝子体液の細胞間質物質において見られる多糖類である、ヒアルロン酸の加水分解を介する結合組織の透過性を修飾する展着または拡散物質である。展着因子が存在しないとき、皮下に注射された物質、例えば、薬物、タンパク質、ペプチドおよび核酸は、非常にゆっくりと拡散する。しかしながら、ヒアルロニダーゼとの共注射は、迅速な拡散を引き起こすことができる。拡散の速度は酵素の量に比例し、拡散の程度は溶液の容量に比例する。

【0260】

本明細書において提供されるPH20、例えば、可溶性PH20、例えば、esPH20は、種々の哺乳動物のインビボ組織のいずれかへ送達剤および分子を促進するか、または増強するために使用することができる。小分子薬理活性物質ならびに大分子薬理活性物質、例えば、タンパク質、核酸およびリボ核酸、ならびに、限定はしないが、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含む成分の組合せを含むことができる高分子組成物の拡散を容易にし、したがって、送達を促進するために使用することができる（例えば、米国公開番号第US20040268425；US20050260186；およびUS20060104968号参照）。PH20、例えば、可溶性PH20、例えば、esPH20は、共に製剤化される薬剤または共に投与される薬剤のバイオアベイラビリティならびに薬物動態学（PK）および/または薬物動力学（PD）特性を改良するための治療剤と、共に投与および/または共に製剤化することができる。可溶性PH20、例えば、esPH20を使用することにより改善することができるPK/PDパラメーターは、 C_{max} （例えば、血流中における吸収後に達成される薬物の最大濃度）、 T_{max} （最大濃度に達するために必要な時間）、 $T_{1/2}$ （濃度が半分にまで減少するために必要な時間）、 C_{min} （代謝および排出後の薬物の最小濃度）、AUC（濃度対時間の曲線下面積、バイオアベイラビリティの全体量の測定値）、種々の興味ある組織における濃度（例えば、所望の濃度に達する速度、全体レベル、および所望のレベルを維持する時間を含む）および E_{max} （達する最大効果）のような測定値を含む。

【0261】

本明細書において提供される処置方法は、治療剤が処置する疾患または障害の処置のための治療剤との組合せ治療を含む。疾患または状態の重症度を改善するおよび/またはさもなければ軽減するあらゆる治療剤を、このような治療剤のバイオアベイラビリティを増加させるために、本明細書において提供される可溶性PH20と組み合わせることができる。特に、本明細書において提供される可溶性PH20ポリペプチド、例えば、esPH20は、記載されているヒアルロニダーゼまたはヒアルロニダーゼ分解酵素の代わりに、出願（例えば、米国公開番号第US20040268425；US20050260186；US20060104968号および米国出願番号第12/381,844、12/386,249、12/387,225および12/386,222号参照）に記載されているそれぞれ、およびすべての組合せにおいて使用することができる。

【0262】

本明細書において提供される可溶性PH20ポリペプチド、特にesPH20ポリペプチドは、治療剤調製物の前に、該物の次に、該物と断続的に、または、該物と同時に投与

10

20

30

40

50

することができる。一般的に、可溶性PH20が間質腔におけるヒアルロン酸を分解することが可能であるため、可溶性PH20は、治療剤調製物の投与の前または該投与と同時に投与される。可溶性PH20は治療分子の投与部位と異なる部位で投与することができ、また可溶性PH20は治療分子の投与部位と同じ部位で投与することができる。

【0263】

ヒアルロニダーゼと共に投与することができる医薬用、治療用および化粧品用薬剤および分子の例は、化学療法または抗癌剤、鎮痛剤、抗生物質、抗炎症剤、抗菌剤、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、鎮痙剤、抗抑制薬、抗関節炎剤、抗真菌剤、抗高血圧剤、解熱剤、駆虫剤、抗ヒスタミン剤、アルファアドレナリン作動性アゴニスト剤、アルファ遮断薬、麻酔薬、気管支拡張剤、殺生物剤、殺菌剤、静菌剤、ベータアドレナリン遮断薬、カルシウムチャンネル遮断薬、心血管作動薬、避妊薬、化粧品用または美的用薬剤、充血除去剤、利尿薬、抑制薬、診断薬、電解質物質、催眠剤、ホルモン剤、血糖上昇剤、筋弛緩剤、筋肉収縮剤、眼科用剤、副交感神経作用薬、精神賦活剤、鎮静剤、睡眠導入剤、交感神経様作用薬、精神安定剤、尿路剤、膿剤、殺ウイルス剤、ビタミン剤、非ステロイド系抗炎症剤またはアンジオテンシン変換酵素阻害剤、およびそれらの任意の組合せを含むが、これらに限定されない。特に、治療剤は、モノクローナル抗体を含む抗体、ビスホスホネート、インスリンおよび免疫グロブリンを含む。

10

【0264】

例えば、典型的な抗生物質は、アミノグリコシド；アンフェニコール；アンサマイシン；カルバセフェム；カルバペネム；セファロsporinまたはセフェム；セファマイシン；クラバム；環状リポペプチド；ジアミノピリミジン；ケトライド；ラコサミド；マクロライド；モノバクタム；ニトロフラン；オキサセフェム；オキサゾリジノン；ペネム、チエナマイシンおよび種々雑多なベータ-ラクタム；ペニシリン；ポリペプチド抗生物質；キノロン；スルホンアミド；スルホン；テトラサイクリン；および他の抗生物質（例えば、クロホクトール、フシジン酸、ヘキサジン、メテナミン、ニトロフラントイン、ニトロキソリン、リチペネム、タウロリジン、キシボモル(Xibomol)）を含むが、これらに限定されない。

20

【0265】

また、典型的な治療剤に含まれるものは、血液修飾因子、例えば、抗血友病因子、活性化プロトロンビン複合体、アンチトロンビンIII、凝固因子Vh、凝固因子VIIII、凝固因子IX、血漿タンパク分画、フォン・ヴィレブランド因子；抗血小板薬（例えば、アブキシマブ、アナグレリド、シロスタゾール、クロピドグレル二硫酸塩、ジピリダモール、エポプロステノール、エプチフィバチド、チロフィバンを含む）；コロニー刺激因子(CSF)（例えば、顆粒球CSFおよび顆粒球マクロファージCSFを含む）；赤血球生成促進因子（例えば、エリスロポエチン、例えば、ダルベポエチンアルファを含む）およびエポエチンアルファ；止血薬およびアルブミン（例えば、アプロチニン、抗血友病因子および血漿の組合せ、酢酸デスマプレシン、およびアルブミンを含む）；免疫グロブリン、ならびにB型肝炎免疫グロブリン；トロンビン阻害剤（例えば、直接トロンビン阻害剤およびレピルジンを含む）およびドロトレコギンアルファ；抗凝固剤（例えば、ダルテパリン、エノキサパリンおよび他のヘパリン、およびワルファリンを含む）である。

30

40

【0266】

可溶性PH20、例えば、esPH20と共に投与および/または共に製剤化により組み合わせられ得る他の典型的な治療剤は、アダリムマブ、アガルシダーゼベータ、アレファセプト、アンピシリン、アナキンラ、抗ポリオワクチン、抗胸腺細胞、アジスロマイシン、ベカブレルミン、カスポファンギン、セファゾリン、セフェピム、セフォテタン、セフトジジム、セフトリアキソン、セツキシマブ、シラスタチン、クラブラン酸、クリンダマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダクリズマブ、ジフテリア、ジフテリア抗毒素、ジフテリアトキソイド、エファリズマブ、エピネフリン、エリスロポエチンアルファ、エタネルセプト、フィルグラスチム、フルコナゾール、卵胞刺激ホルモン、フォリトロピンアルファ、フォリトロピンベータ、ホスフェニトイン、ガドジアミド、ガドペンテト酸、ガ

50

チフロキサシン、グラチラマー、GM-CSF、ゴセレリン、酢酸ゴセレリン、グラニセ
 トロン、インフルエンザ菌B、ハロペリドール、肝炎ワクチン、A型肝炎ワクチン、B型
 肝炎ワクチン、イブリツモマブチウキセタン、イブリツモマブ、チウキセタン、免疫グロ
 ブリン、インフルエンザ菌ワクチン、インフルエンザウイルスワクチン、インフリキシマ
 ブ、インスリン、インスリングルルギン、インターフェロン、インターフェロンアルファ
 、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、インターフェロンアルファ-2a
 、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ-1、インターフェロン
 アルファn3、インターフェロンベータ、インターフェロンベータ-1a、インターフェ
 ロンガンマ、インターフェロンアルファ-コンセンサス、イオジキサノール、イオヘキソ
 ール、イオパミドール、イオベルソール、ケトロラク、ラロニダーゼ、レボフロキサシン 10
 、リドカイン、リネゾリド、ロラゼパム、麻疹ワクチン、麻疹ウイルス、ムンプスウイル
 ス、麻疹-おたふく風邪-風疹ウイルスワクチン、風疹ワクチン、メドロキシプロゲステ
 ロン、メロペネム、メチルプレドニゾロン、ミダゾラム、モルヒネ、オクトレオチド、オ
 マリズマブ、オndanセトロン、パリピズマブ、パントプラゾール、ペガスパルガーゼ、
 ペグフィルグラスチム、ペグ-インターフェロンアルファ-2a、ペグ-インターフェロ
 ンアルファ-2b、ペグピソマント、百日咳ワクチン、ピペラシリン、肺炎球菌ワクチン
 および肺炎球菌複合体ワクチン、プロメタジン、レテブラーゼ、ソマトロピン、スルバク
 タム、スマトリプタン、タゾバクタム、テネクテブラーゼ、破傷風菌精製トキソイド、チ
 カルシリン、トシツモマブ、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアム
 シノロンヘキサセトニド、バンコマイシン、水痘帯状疱疹免疫グロブリン、水痘ワクチン 20
 、他のワクチン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン
 、アミホスチン、アナストロゾール、ヒ素、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、カルメット
 ・ゲラン菌(BCG)ワクチン、BCG Live、ベキサロテン、ブレオマイシン、ブ
 スルファン、ブスルファン静脈内、ブスルファン経口、カルステロン、カペシタビン、カル
 ボプラチン、カルムスチン、ポリフェプロザンを伴うカルムスチン、セレコキシブ、ク
 ロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラビン、リボゾ
 ーマルシタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、リボゾーマルダウノルピシン、ダ
 ウノルピシン、ダウノマイシン、デニロイキンジフチトクス、デクスラゾキササン、ドセタ
 キセル、ドキシソルピシン、リボゾーマルドキシソルピシン、プロピオン酸ドロモスタノロン
 、エリオットB溶液、エピルピシン、エポエチンアルファ、エストラムスチン、エトボシド 30
 、リン酸エトボシド、エトボシドVP-16、エキセメスタン、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、フルベストラント、ゲムシタビ
 ン、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ヒドロキシウレア、
 イダルピシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、イリノテカン、レトロゾール、ロ
 イコボリン、レバミソール、ロムスチン、CCNU、メクロレタミン、ナイトロジェンマ
 スタード、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、L-PAM、メルカプ
 トプリン、6-メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマ
 イシン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、フェンプロピ
 オン酸ナンドロロン、ノフェツモバブ、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキ
 セル、パミドロネート、ペガデマラーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン 40
 、ミトラマイシン、ポルフィマー、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリ
 ン、ラスブリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タルク、タ
 モキシフェン、テモゾロマイド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、6-チオ
 グアニン、トリエチレンチオホスホルアミド(チオテパ)、トポテカン、トレミフェン、
 トラスツマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルピシン、ピンブラスチン、ピ
 ンクリスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、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、レチノイン酸、アリトレチノイン
 、9-シス-レチノイン酸、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、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナキシロン、アンシタピン、アントラマイシ
 ン、アバジコン、アルギメスナ、アスペルリン、アトリムスチン、アザシチジン、アゼテ 50

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、ベナキシピン、
 ベンダムスチン、ベンゾデパ、ピカルタミド、ピエタセルピン、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、ボルテゾミブ、ブレキナル、プロピリミン
 、ブドチタン、カクチノマイシン、カネルチニブ、カラセミド、カルベチマー、カルボコ
 ン、カルモフル、カルピシン、カルゼレシン、セデフィンゴール、セマドチン、クロー
 ムブシル、シオテロネル、シロレマイシン、クランフェヌル、クロファラビン、クリスナ
 トール、デシタピン、デクスニグルジピン、デキソルマブラチン、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、ドフェキダル、ドキ
 シフルリジン、ドロロキシフェン、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、エフロルニチン(Eflomithine)、エラクリダル、エリナフィド、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、エピブ
 ロピジン、エプタロプロスト、エルプロゾール、エソルピシン、エタニダゾール、エトグ
 ルシド、エトプリン、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
 、フルオキシメステロン、フルロシタピン、ホスキドン、ホストリエシン、ホトレタミン
 、ガラルピシン、ガロシタピン、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、イルモホシン、イロマスタット、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、インターロイキン、インターロイキン - 2、組換えイン
 ターロイキン、イントプリシン、ヨーベングアン(lobenguane)、イプロプラチン、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、リュープロリド、リュープロレリン、レキサカルシトール、リア
 ロゾール、ロパプラチン、ロメトレキソール、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(Mechiorethamine)、メレンゲストロール、メルファラン(Me
 iphalan)、メノガリル、メピチオスタン、メテシンド、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、ミトナ
 フィド、ミトキドン、ミトスペル、ミトゾロミド、ミボプリン、ミゾルピン、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、ネダプラチン、ネイザラビン(Nei
 zarabine)、ネモルピシン、ニトラクリン、ノコダゾール、ノガラマイシン、ノラトレキ
 セド、ノルトピキサントロン、オルマプラチン、オルタタキセル、オテラシル、オキシス
 ラン、オキシフェナルシン、パツピロン、ベルデシン、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、ピボスルファン、ピルフェニドン、ピロキサントロン、ピ
 キキサントロン、プレビトレキセド、プロメスタン、ポルフィロマイシン、プレドニムスチ
 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、ラニ
 ムスチン、リボプリン、リトロスルファン、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、サトラプラチン、セプリプラチン、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、
 スクアラミン、ストレプトニグリン、ストレプトバリシン、スホスファミド、スロフェヌ
 ル、タセジナリン、タリソマイシン、タリムスチン、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、テロキシロン、チアミプリ
 ン、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、トラベクテジン、エクチナサイジン743、トレス
 トロン、トリシリピン、トリロスタン、トリメトレキサート、四硝酸トリプラチン、トリ
 プトレリン、トロホスファルニド(Trofosfarnide)、ツプロゾール、ウベニメクス、ウレ
 デパ、バルスポダール(Vaispodar)、パブレオチド、ベルテボルフィン、ピンブラスチン(
 Vinbiastine)、ピンデシン、ピネピジン、ピNFLニン、ピンホルミド、ピングリシネー
 ト、ピンロイシノール、ピンロイロシン、ピンロシジン、ピントリプトール、ピンゾリジ
 ン、ポロゾール、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[

10

20

30

40

50

2 - H]、ジノスタチン、ゾルピシン、ゾスキダル、アセタゾラミド、アシクロビル、アジピオドン、アラトロフロキサシン、アルフェンタニル、アレルゲン抽出物、アルファ1 - プロテイナーゼ阻害剤、アルプロスタジル、アミカシン、アミノ酸、アミノカプロン酸、アミノフィリン、アミトリプチリン、アモバルピタール、アムリノン、鎮痛剤、抗ポリオワクチン、抗狂犬病血清、抗破傷風菌免疫グロブリン、破傷風菌ワクチン、アンチトロンピンIII、抗毒素血清、アルガトロバン、アルギニン、アスコルビン酸、アテノロール、アトラクリウム、アトロピン、オーロチオグルコース、アザチオプリン、アズトレオナム、バシトラシン、バクロフェン、バシリキシマブ、安息香酸、ベンズトロピン、ベタメタゾン、ピオチン、ピパリルジン、ボツリヌス抗毒素、プレチリウム、ブメタニド、ブピバカイン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、カルシトニン、カルシトリオール、カルシウム、カプレオマイシン、カルボプロスト、カルニチン、セファマンドール、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフォキシチン、セフチゾキシム、セフロキシム、クロラムフェニコール(Chloramphenicol)、クロロプロカイン(Chloroprocaine)、クロロキン(Chloroquine)、クロロチアジド、クロロプロマジン(Chlorpromazine)、コンドロイチン硫酸、コリオゴナドトロピンアルファ、クロミウム、シドフォビル、シメチジン、シプロフロキサシン、シスアトラクリウム、クロニジン、コデイン、コルヒチン(Coichicine)、コリスチン、コラーゲン、コルチコレリンヒツジトリフルタート、コルチコトロピン、コシントロピン、シアノコバラミン、シクロスポリン、システイン、ダクリズマブ(Dacliximab)、ダルホプリスチン、ダルテパリン、ダナパロイド、ダントロレン、デフェロキサミン、

10

20

デス
モプレシン、デキサメタゾン、デクスメドミジン、デクスパンテノール、デキストラン、鉄デキストラン、ジアトリゾ酸、ジアゼパム、ジアゾキシド、ジサイクロミン、ジギバインド、ジゴキシム、ジヒドロエルゴタミン、ジルチアゼム、ジフェンヒドラミン、ジピリダモール、ドブタミン、ドーパミン、ドキサクリウム、ドキサブラム、ドキセルカルシフェロール、ドキシサイクリン、ドロペリドール、ダイフィリン、エデト酸、エドロホニウム、エナラプリラート、エフェドリン、エポプロステノール、エルゴカルシフェロール、エルゴノピン、エルタペネム、エリスロマイシン、エスモロール、エストラジオール、エストロゲン、エタクリン酸、エタノールアミン、エタノール、ヨード化ケシ油エチルエステル(Ethiodized oil)、エチドロン酸、エトミダート、因子VIIII、ファモチジン、フェノルドパム、フェンタニル、フルマゼニル、フルオレセイン、フルフェナジン、葉酸、
フォメピゾール、ホミビルセン、フォンダパリヌクス、ホスカルネット、ホスフェニトイン、フロセミド、ガドテリドール、ガドベルセタミド、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、グルカゴン、グルコース、グリシン、グリコピロラート、ゴナドレリン、絨毛性ゴナドトロピン、インフルエンザB型多糖体、ヘミン、ハーバル、ヒスタミン、ヒドララジン、ヒドロコルチゾン、ヒドロモルフォン、ヒドロキソコバラミン、ヒドロキシジン、ヒヨスチアミン、イブチリド、イミグルセラゼ、インジゴカルミン、インドメタシン、アイオダイド、イオプロミド(Iopromide)、イオタラム酸、イオキサグル酸(Ioxaglic acid)、イオキシラン(Ioxilan)、イソニアジド、イソプロテレノール、日本脳炎ワクチン、カナマイシン、ケタミン、ラベタロール、レピルジン、レボブピバカイン、レボチロキシム、リンコマイシン、リオチロニン、黄体形成ホルモン、ライム病ワクチン、マンガホジピール、マンストール(Manthtol)、髄膜炎菌多糖ワクチン、メペリジン、メピバカイン、メソリダジン、メタラミノール、メタドン、メトカルバモール、メトヘキシタール、メチルドベート、メチルエルゴノピン、メトクロプラミド、メトプロロール、メトロニダゾール、ミノサイクリン、ミバクリウム、モルルイック酸(Morrhuic acid)、モキシフロキサシン、ムロモナブ - CD3、ミコフェノール酸モフェチル、ナフシリン、ナルブフィン、ナルメフェン、ナロキソン、ネオスチグミン、ナイアシンアミド、ニカルジピン、ニトログリセリン、ニトロプルシド、ノルエピネフリン、オルフェナドリン、オキサシリン、オキシモルホン、オキシテトラシクリン、オキシトシン、パンクロニウム、パンテノール、パントテン酸、パパベリン、ペグインターフェロン - アルファ(例えば、インターフェロンアルファ2aまたは2b)、ペニシリンGs、ペンタミジン、ペンタゾシン、ペントバルビ

30

40

50

タール、ペルフィウトレン(Perfiutren)、ペルフェナジン、フェノバルビタール、フェン
 トラミン、フェニルエフリン、フェニトイン、フィゾスチグミン、フィトナジオン、ポリ
 ミキシンb、プラリドキシム、プリロカイン、プロカインアミド、プロカイン、プロクロ
 ルペラジン(Prochlorperazine)、プロゲステロン、プロプラノロール、ピリドスチグミン
 水酸化物、ピリドキシン、キニジン、キヌプリスチン、狂犬病免疫グロブリン、狂犬病ワ
 クチン、ラニチジン、レミフェンタニル、リボフラビン、リファンピン、ロピバカイン、
 サマリウム、スコポラミン、セレンウム、セルモレリン、シンカリド、ソマトレム、スペ
 クチノマイシン、ストレプトキナーゼ、ストレプトマイシン、サクシニルコリン、スフェ
 ンタニル、スルファメトキサゾール、タクロリムス(Tacrolirnus)、テルブタリン、テリ
 パラチド、テストステロン、破傷風抗毒素、テトラカイン、テトラデシル硫酸、テオフィ
 リン、チアミン、チエチルペラジン、チオペンタール、甲状腺刺激ホルモン、チンザパリ
 ン、チロフィバン、トブラマイシン、トラゾリン、トルブタミド、トルセミド、トラネキ
 サム酸、トレプロスチニル、トリフルオペラジン、トリメトベンズアミド、トリメトプリ
 ム、トロメタミン、ツベルクリン、腸チフスワクチン、ウロフォリトロピン、ウロキナー
 ゼ、バルプロ(Vaiproic)酸、バソプレシン、ベクロニウム、ベラパミル、ポリコナゾール
 、ワルファリン、黄熱病ワクチン、ジドブジン、亜鉛、ジプラシドン塩酸塩、アクラシノ
 マイシン、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アザセリン、6 - アザウリジン、カル
 チノフィリン、クロモマイシン、デノプテリン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイ
 シン、エノシタピン、フロキシウリジン(Loxuridine)、オリゴマイシン(Olivomycine)、
 ピラルピシン、ピリトレキシム、プテロプテリン、テガフル(Tagafur)、ツベルシジン
 、アルテプラーゼ、アルシツモマブ、ベバシズマブ、ボツリヌス毒素A型、ボツリヌス毒
 素B型、カプロマブペンデチド、ダクリズマブ、ドルナーゼアルファ、ドロトレコギンア
 ルファ、イムシロマブペンテテート、およびヨウ素 - 131を含むが、これらに限定され
 ない。

10

20

【0267】

特に、治療剤は、免疫グロブリン、インターフェロンベータ、インターフェロンアルフ
 ァ - 2 a、インターフェロンアルファ - 1、インターフェロンアルファ - n3、インター
 フェロンベータ - 1、インターフェロンベータ - 1 a、インターフェロンガンマ - 1 b、
 ペグ - インターフェロンアルファ - 2 およびペグインターフェロンアルファ - 2 b、イン
 スリン、ビスリン酸(例えば、パミドロネートまたはゾレドロネート)、ドセタキセル、
 ドキソルピシン、リポゾーマルドキソルピシンおよびベバシズマブを含むが、これらに限
 定されない。

30

【0268】

2. 過剰なグリコサミノグリカナーゼを除去するための使用

可溶性PH20、一般的に可溶性ヒアルロニダーゼを含む組成物単独または、他の処置
 および/もしくは薬剤と組み合わせて、もしくは加えての投与により、ヒアルロナン関連
 疾患および状態を処置するための方法を、本明細書において提供される。ヒアルロナン関
 連状態および疾患は、ヒアルロナンレベルが疾患または状態における原因、結果または観
 察される他のものとして上昇する疾患および状態であり、組成物ヒアルロニダーゼ、例え
 ば、可溶性PH20単独または他の処置および/もしくは薬剤と組み合わせて、もしくは
 加えての投与により処置することができる。

40

【0269】

一般的に、ヒアルロナン関連疾患および状態は、対照、例えば、他の組織、細胞または
 体液と比較して、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)におけるヒアルロナン発現の上昇と関連する。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、処置されるサンプルと類似であるが、異なる対
 象、例えば、正常である(すなわち、疾患または状態を有さないか、または処置される対
 象が有する疾患または状態の型を有さない)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、重度でない、および/またはヒアルロナン関連でな

50

いか、または比較的少ないヒアルロナンを発現し、したがってより少ない程度にヒアルロナン関連である、類似の疾患または状態を有する他の対象由来の類似の組織と比較して上昇したものであり得る。例えば、処置される対象は、組織、細胞または流体におけるHA量が、あまり重度でない癌、例えば、初期、分化型または他の癌の型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。他の例において、細胞、組織または流体は、既知量または相対量のHAを有する対照サンプル、例えば、流体、組織、抽出物（例えば、細胞または核抽出物）、核酸またはペプチド調製物、細胞系、生検、標準または他のサンプル、例えば、比較的低いレベルのHAを発現することが知られているサンプル、例えば、腫瘍細胞系、例えば、低いレベルのHAを発現する本明細書に記載されている典型的な腫瘍細胞系、例えば、HCT116細胞系、HT29細胞系、NCIH460細胞系、DU145細胞系、Capan-1細胞系およびこのような細胞系を使用して作製した腫瘍モデル由来の腫瘍と比較して、上昇したレベルのヒアルロナンを含む。

10

【0270】

いくつかの場合において、ヒアルロナン関連疾患および状態は、組織、例えば、腫瘍における間質液圧の増加、血管容量の減少、および/または水分含有量の増加と関連する。1つの例において、本明細書において提供される組成物および化合物での処置は、疾患または状態と関連する1つ以上のこれらの症状または他の症状を改善する、例えば、対象の生存または生活の質を経時的に向上するか、または腫瘍増殖を阻止する。

【0271】

20

提供された酵素、組成物および方法を使用して処置することができる典型的なヒアルロナン関連疾患および状態は、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、末期癌、転移性癌、未分化癌、卵巣癌、*in situ*癌腫（ISC）、扁平上皮癌腫（SCC）、前立腺癌、膵臓癌、非小細胞性肺癌、乳癌、大腸癌および他の癌を含むが、これらに限定されない。

【0272】

また、典型的なヒアルロナン関連疾患および状態は、間質液圧の上昇と関連する疾患、例えば、椎間板圧迫および浮腫と関連する疾患、例えば、臓器移植、卒中、脳外傷または他の損傷により引き起こされる浮腫である。典型的なヒアルロナン関連疾患および状態は、間質液圧の上昇、血管容量の減少、および/または組織における水分含有量の増加と関連する疾患および状態、例えば、癌、椎間板圧迫および浮腫を含む。1つの例において、ヒアルロナン関連状態、疾患または障害の処置は、改善、低減、または、間質液圧（IFP）の増加、血管容量の減少および組織における水分含有量の増加の1つ以上における他の有益な効果を含む。

30

【0273】

一般的に、ヒアルロナン関連疾患または状態は、例えば、病変組織、例えば、腫瘍におけるHA発現の増加と関連する。1つの例において、HALO（ヒアルロナンを含む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）は、対象の組織、例えば、病変組織において形成する。他の例において、HALOの存在は、インビトロでの対象の組織、例えば、病変組織由来の細胞培養物において検出される。

40

【0274】

a. 癌の処置における使用

ヒアルロニダーゼは、腫瘍におけるヒアルロン酸の破壊により直接的な抗発癌作用を有する。したがって、可溶性PH20ヒアルロニダーゼ、例えば、eSPH20は、腫瘍、特に、ヒアルロナンリッチな腫瘍を処置するために使用することができる。ヒアルロナンリッチな癌は、癌細胞がHAを生産する癌、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、組織学的染色により測定される）、HAS2が上昇している癌（ヒアルロナンシンターゼ2）、インビトロでヒアルロニダーゼ（HYAL1）を生産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ための任意の方法およびタンパク質/mRNA発現をアッセイするための他の既知の方法

50

により同定することができる。

【0275】

いくつかのヒアルロナンリッチな癌が同定されている。いくつかの場合において、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、血管形成、他の組織/領域への癌細胞浸潤および他の予後不良の指標と相関する。このような相関関係は、例えば、ヒアルロナンリッチな腫瘍、例えば、卵巣癌、SCC、ISC、前立腺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)を含む肺癌、乳癌、大腸癌および膵臓癌において観察されている(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)参照)。したがって、ヒアルロナンリッチな癌は、1つ以上の癌の症状を処置するために、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20の投与により処置することができる。ヒアルロナンリッチな腫瘍は、前立腺、乳房、大腸、卵巣、胃、頭頸部および他の腫瘍および癌を含むが、これらに限定されない。

10

【0276】

ヒアルロニダーゼは、また、慣用の化学療法に対して耐性である腫瘍の感受性を増加させるために使用することができる。例えば、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、腫瘍部位周囲の拡散を増加させるために(例えば、腫瘍部位および周囲の化学療法剤の循環および/または濃度を促進するために)、例えば、ヒアルロン酸分解により、腫瘍細胞運動性を阻害するために、および/または腫瘍細胞アポトーシス域値を低下させるために有効な量で、HYAL1欠失と関連する腫瘍を有する患者に投与することができる。これによって、腫瘍細胞をアノキスの状態に至らせることができ、これは腫瘍細胞を、化学療法剤の作用に対してより感受性にする。ヒアルロニダーゼの投与は、膵臓、胃、大腸、卵巣および乳房のこれまでは化学療法耐性であった腫瘍の応答性を誘導することができる(Baumgartner et al. (1988) *Reg. Cancer Treat.* 1:55-58; Zanker et al. (1986) *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 27:390)。したがって、可溶性PH20単独での癌の処置に加えて、本明細書において提供される組成物および方法は、また、化学療法剤もしくは他の抗癌剤または処置と、例えば、同時に、または前に、組み合わせることで可溶性PH20の投与によりヒアルロナン関連癌を処置するために使用することができる。この例において、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、一般的に、固形腫瘍への化学療法剤または他の抗癌剤の浸透を増強し、それにより疾患を処置する。

20

30

【0277】

可溶性PH20を含む組成物は、抗癌剤と共に腫瘍内に、または播種性癌または到達が難しい腫瘍に対して静脈内に投与することができる。抗癌剤は、化学療法剤、抗体、ペプチドまたは遺伝子治療ベクター、ウイルスまたはDNAであり得る。さらに、ヒアルロニダーゼは、多剤耐性を獲得している以前に化学物質難治性の腫瘍における増感のために、腫瘍細胞を循環プールに動員するために使用することができる(St Croix et al., (1998) *Cancer Lett* September 131(1): 35-44)。

40

【0278】

可溶性PH20、例えば、esPH20の投与後、同時または投与前に投与することができる典型的な抗癌剤は、以下のものを含むが、これらに限定されない。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-シス-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、三酸化ヒ素、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、BCG Live、ベナキシピン、ベンダムスチン、ベンゾ

50

デバ、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、ビリコダル、ピサ
 ントレン、ピサントレン、ビスナフィドジメシレート、ピゼレシン、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、カペシタピン、カラセミド、カルベチマー、カルボブラ
 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、クラドリピン、クランフェヌル
 、クロファラピン、クリスナトール、シクロホスファミド、リポゾーマルシタラピン、シ
 タラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、リポゾーマルダ
 ウノルピシン、ダウノルピシン/ダウノマイシン、ダウノルピシン、デシタピン、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、デクスラゾキサソ、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、リポゾーマルドキソルピシン、ドキシ
 ソルピシンHCL、ドコルピシンHCLリポソーム注射剤、ドキシソルピシン、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、エピルピシン、エポエチンアルファ、エプタロプロスト、エルプロゾ
 ール、エソルピシン、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VP-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、ファザラピン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フロクスウリ
 ジン、フルダラピン、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
 、フルロシタピン、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、ガラルピシン、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、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ/チウキセタン、イダルピシン、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、インターフェロンアルファ-2a、インター
 フェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インター
 フェロンガンマ、インターフェロン、インターロイキン-2s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/C
 CNU、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、ミゾルピン、モファロテン、モビダモール、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、ネルザラピン、ネモルピシン、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、ペガデマーゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム

10

20

30

40

50

、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、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、サトラプラチン、セプリプラチン、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、スピロブラ
 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 - 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、テコガラン、テガフル、テロキサントロン、テモボルフィン、テモゾロマ
 イド、テニポシド/V M - 2 6、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、ウレデパ、バルルピシン、バルスポダル、パブレオチド、ベル
 テボルフィン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピネピジン、ピンフルニ
 ン、ピンホルミド、ピングリシネート、ピンロイシノール、ピンロイロシン、ピノレルピ
 ン、ピンロシジン、ピントリプトール、ピンゾリジン、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
 ネット、ゾルピシンおよびゾスキダル、例えば：

【0279】

アルデスロイキン(例えば、PROLEUKIN(登録商標))、アレムツズマブ(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、MY
 LERANTM)、カルステロン(例えば、METHOSARB(登録商標))、カペシ
 タピン(例えば、XELODA(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
))、ポリフェプロザンを伴うカルムスチン(例えば、GLIADEL(登録商標)Wa
 fer)、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))、クラドリピン(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))、シタラピン(例えば、CYTOSAR - U(登録商標))、リボゾー
 マルシタラピン(例えば、DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(例えば、DT
 IC - 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))、リボゾーマルダウノル

10

20

30

40

50

ビシン（例えば、DANUオキシソム（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（例えば、ZINECARD（登録商標））、ドセタキセル（例えば、TAXOTERE（登録商標））、ドキシソルビシン（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HCLリボソーム注射剤（例えば、DOXIL（登録商標））を含むリボソーマルドキシソルビシン、プロピオン酸ドロモスタノロン（例えば、ドロモスタノロン（登録商標）およびMASTERONE（登録商標）注射剤）、エリオットB溶液（例えば、エリオットB溶液（登録商標））、エピルピシン（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、VEPESID（登録商標））、エキセメスタン（例えば、AROMASIN（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、FLUDARA（登録商標））、5-FUを含むフルオロウラシル（例えば、ADRUCIL（登録商標））、フルベストラント（例えば、FASLODEX（登録商標））、ゲムシタピン（例えば、GEMZAR（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））、ヒドロキシウレア（例えば、HYDREA（登録商標））、イブリツモマブ/チウキセタン（例えば、ZEVALIN（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））、インターフェロンアルファ-2a（例えば、ROFERON-A（登録商標））、インターフェロンアルファ-2b（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）、ロイコボリン（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-MPを含むメルカプトプリン（例えば、PURINETHOL（登録商標））、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）、MITOZYTREX（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））、ノフェツモバブ（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、ELOXATIN（登録商標））、パクリタキセル（例えば、PAXENE（登録商標）、TAXOL（登録商標））、パミドロネート（例えば、AREDIA（登録商標））、ペガデマーゼ（例えば、ADAGEN（登録商標））、ペガスパルガーゼ（例えば、ONCASPAR（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、PHOTOFRIN（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、ATA塩水（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

エン（例えば、NOLVADEX（登録商標））、テモゾロマイド（例えば、TEMODAR（登録商標））、テニポシド/V M - 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-TGを含むチオグアニン、チオテパ（例えば、チオPLEX（登録商標））、トポテカン（例えば、HYCAMTIN（登録商標））、トレミフェン（例えば、FARESTON（登録商標））、トシツモマブ（例えば、BEXXAR（登録商標））、トラスツマブ（例えば、HERCEPTIN（登録商標））、トレチノイン/A TRA（例えば、VESANOID（登録商標））、ウラシルマスタード、バルルピシン（例えば、VALSTAR（登録商標））、ピンブラスチン（例えば、VELBAN（登録商標））、ピンクリスチン（例えば、ONCOVIN（登録商標））、ビノレルピン（例えば、NAVELBINE（登録商標））およびゾレドロネート（例えば、ZOMETA（登録商標））。

10

【0280】

1つの例において、可溶性PH20、例えば、esPH20、例えば、ペグ化されたrHuPH20は、1種以上のドセタキセル（例えば、TAXOTERE（登録商標））、リポゾーマルドキソルピシン（例えば、DOXIL（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））の投与後、同時または投与前に対象に投与される。

【0281】

したがって、本明細書において提供される可溶性PH20ポリペプチドは、非癌性細胞と比較して内因性ヒアルロニダーゼ活性の減少を有するものを含む、転移性および非転移性癌の処置において使用することができる。ヒアルロニダーゼは、単独または他の化学療法と組み合わせて、化学療法剤として使用することができる。典型的な癌は、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レベルの低下もしくはヒアルロン酸異化の減少と関連する他のあらゆる癌を含むが、これらに限定されない。

20

【0282】

b. 脳におけるグリコサミノグリカン蓄積の処置における使用

ヒアルロン酸レベルは、多くの脳脊髄の病理学的状態において上昇する。脳脊髄のヒアルロン酸のレベルは、通常、成人において200 μg/L未満であるが（Laurent et al. (1996) Acta Neurol Scand September 94(3):194-206）、髄膜炎、脊髄の狭窄、頭部外傷および頭部外傷のような疾患において8000 μg/Lを越えるレベルに上昇し得る。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性rHuPH20は、非常に上昇したレベルの基質を分解することができる。

30

【0283】

脳において有効なリンパ管の欠如は、また、頭部外傷後に、致命的な浮腫を引き起こし得る。ヒアルロン酸蓄積は、ヒアルロン酸シンターゼにより合成の増加および分解の減少の結果である。ヒアルロン酸の蓄積は、最初に、白血球の溢出を促進するために、損傷を受けた組織における水分含有量の増加の有益な目的に役立ち得るが、蓄積の継続は致死であり得る。頭部外傷を有する患者に、例えば、髄腔内または静脈内へのヒアルロニダーゼの投与は、組織ヒアルロン酸蓄積およびそれと関連している水を除去するために役立ち得る。

40

【0284】

可溶性PH20は、また、脳腫瘍と関連する浮腫、特に多形性グリア芽腫と関連するものの処置において使用することができる。脳腫瘍と関連する浮腫は、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をもたらす。ヒアルロン酸蓄積の部位への可溶性PH20ヒアルロニダーゼの投与（例えば、静脈内注射によるか、またはシャントを介する）は、これらの部位で過剰なヒアルロン酸を分解することにより、このような悪性腫瘍と関連する浮腫を軽減することができる。

【0285】

c. 心臓血管疾患におけるグリコサミノグリカン蓄積の処置における使用

50

可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、いくつかの心臓血管疾患の処置において使用することができる。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の投与は、梗塞のサイズを減少させることができる(Maclean, et al (1976) Science 194(4261):199-200)。これにより提案される1つのメカニズムは、虚血再かん流後に起こるヒアルロン酸蓄積を減少させることにより起こり得る。梗塞のサイズの減少は、リンパ排出の増加および組織酸素化の増加および心筋水分含有量の減少から起こると考えられる。

【0286】

可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、また、動脈硬化症から冠動脈プラークを制限するために使用することができる。このようなプラークは、グリコサミノグリカン蓄積、マクロファージを介在し、細胞接着を形成する(Kolodgie et al. (2002) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22(10):1642-8)。

10

【0287】

d. 硝子体切除ならびに眼科疾患および状態における使用

ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、硝子体切除中の網膜の剥離または断裂を最小にするために使用することができる。これは、例えば、硝子体の除去前に、硝子体が網膜から分離される、または「放出される」ようにする。このような硝子体の放出または分離は、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することができる。

【0288】

ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、米国特許第5,292,509号に記載されている硝子体切除補助剤適用を含む種々の眼適用のために使用することができる。高度に精製されたヒアルロニダーゼ、例えば、本明細書において提供される可溶性PH20の使用は、免疫原性および毒性を最小化するための眼内処置のために好ましい。

20

【0289】

可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、例えば、新血管形成を防止し、硝子体からの網膜に対して有毒な物質のクリアランス速度を増加させることにより、眼科疾患を処置および/または予防するために使用することができる。可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、眼に対する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ために有効な量で投与することができる。硝子体液の液化は、硝子体房(vitreous chamber)からの液体交換速度を増加させる。この交換における増加は、存在が眼科的および網膜損傷を引き起こし得る汚染物質を除去する。

30

【0290】

可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、また、術後圧力を減少させるために使用することができる。ヒアルロン酸は、主に白内障および眼内レンズ外科手術中のスパーサーとして、眼において使用されてきた。それは、また、他の眼の外科手術、例えば、緑内障、硝子体および網膜手術ならびに角膜移植において使用される。術後白内障患者において起こる一般的な副作用は、著しく早期の、および時折長期の、眼圧の上昇である。このような状態は、ときどき、とりわけ緑内障性視神経乳頭変化を有する患者において深刻である。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、手術の前に眼にヒアルロン酸と共投与し、眼における術後圧力を減少させることができる。ヒアルロニダーゼは、手術中に有効性を減少させず、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り眼圧を術前レベルに減少させるために有効な量で投与される(米国特許第6,745,776号)。

40

【0291】

可溶性PH20ヒアルロニダーゼは、また、小柱網からグリコサミノグリカンを除去し、眼圧を低下させるために、緑内障を有する患者に投与することができる。例えば、糖尿病性網膜症、網膜新血管形成、網膜静脈閉塞、後部硝子体剥離、網膜裂傷、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、硝子体への血液の溢出)の解決を促進するために、硝子体に適用することができる。一般的に解決が遅い硝子体出血の存在は、しばしば、増殖性糖尿病性網膜症のような状態に対する主な処置であるレーザー光凝固のよ

50

うな、診断および/または処置方法のために、網膜が硝子体を介して視覚化される必要がある方法を遅延、複雑化、または防止し得る。

【0292】

e. 皮下注入における使用

皮膚の皮下組織への流体および電解質の注入である皮下注入は、軽度から中程度の脱水状態の成人患者、とりわけ高齢者に適当な有用かつ単純な水分補給技術である。安全かつ有効であると考えられるが、多数の頻繁な副作用は、局所マッサージまたは全身利尿薬により処置することができる軽度の皮下浮腫である。約3Lを、2つの別々の部位で24時間に与えることができる。一般的な注入部位は、胸部、腹部、大腿部および上腕部を含む。皮下注入において使用される溶液は、例えば、生理食塩水、2分の1生理食塩水、塩水を有するグルコースおよび5%のグルコースを含む。塩化カリウムを、また、該溶液に加えることができる。溶液へのヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20の添加は、流体吸収を増強し、全投与速度を増すことができる。

10

【0293】

f. 遺伝子治療における使用

インビボでの多数の遺伝子送達ビヒクルの有効性は、インビトロで見られ、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、多数の細胞型へのDNAおよびウイルスベクターの移動および拡散を妨げることができる。このような細胞外マトリックス物質のレベルは、該プロセスをかなり妨げることができる。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20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、遺伝子治療の送達を増強することができる。例えば、可溶性PH20は、インビボでのDNAの形質導入を容易にするために、コラゲナーゼと投与することができる (Dubensky et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81(23):7529-33)。ヒアルロニダーゼは、また、アデノ随伴ウイルスを使用して、遺伝子治療を増強することができる (Favre et al. (2000) Gene Therapy 7(16):1417-20)。ヒアルロニダーゼの投与後に開かれるチャンネルは、一般的に、小分子、例えば、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 (ならびに興味ある他の治療剤および薬物) の拡散を増強するサイズである。しかしながら、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。

20

【0294】

いくつかの例において、ウイルスを、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20を発現し、それらの複製および標的組織内の広がりを容易にするように操作することができる。標的組織は、例えば、癌性組織であってよく、ウイルスを腫瘍内で選択的複製を可能にする。ウイルスは、また、組織特異的プロモーターの下で選択的に複製する非溶菌性ウイルスであり得る。ウイルスが複製するため、ヒアルロニダーゼのウイルス遺伝子との共発現は、インビボでウイルスの広がりを容易にすることができる。

30

【0295】

g. 化粧用途

ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、投与することにより、セルライトの蓄積に關与するグリコサミノグリカンを除去し、リンパ流量を促進することができる。例えば、可溶性PH20は、セルライトの処置のために使用することができる。ヒアルロニダーゼは、反復皮下注射を介して、軟膏もしくはクリーム形態の経皮送達を介して、または注射可能な持続放出製剤の使用を介して、グリコサミノグリカンの連続分解を容易にし、それらの回帰を防止するために投与することができる。

40

【0296】

ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性PH20は、また、「豚皮状」浮腫または「オレンジ皮状」浮腫のような状態を処置するために使用することができる。ヒアルロニダーゼは、結合水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の保持に關与する、真皮中に蓄積され得る長いムコ多糖鎖の脱重合を達成することができる。脂質細胞の脂肪過負荷と關連するこのような水および廃棄物の保持は、従来の「豚皮状」浮腫または「オレンジ皮状」浮腫を構成する。脱重合は、ムコ多糖類の長い鎖を短い鎖に切断

50

し、結合水および廃棄物の排出ならびに静脈およびリンパ循環の回復をもたらし、局所浮腫の消失になり得る。

【0297】

h. 臓器移植における使用

臓器中のヒアルロン酸の含量は、炎症で増加され得る。ヒアルロン酸の濃度の増加は、炎症性 - 免疫学的傷害、例えば、肺炎 (Nettelblatt 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) により特徴付けられる異なる臓器由来の組織において観察されている。他の例は、腎臓 (Hallgren et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 2063-2076; Wells et al. (1990) Transplantation 50: 240-243)、小腸 (Wallander et al. (1993) Transplant. Int. 6: 133-137) もしくは心臓 (Hallgren et al. (1990) J Clin Invest 85:668-673) 移植後の同種移植片拒絶反応、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) を含む。臓器の移植に関連する間質浮腫の発生は、移植手術の分野においていくつかの問題となる。間質浮腫を有する移植片は、機能が一時的に喪失される程度に膨潤し得る。場合によっては、膨潤は腎臓の破壊を引き起こし、大量出血を引き起こし得る。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性 PH 20 は、臓器移植における蓄積したグリコサミノグリカン分解のために使用することができる。このようなグリコサミノグリカンの除去は、移植片からの水の除去を促進し、したがって臓器機能を増強する。

10

【0298】

i. 肺疾患における使用

正常個体由来の気管支肺胞洗浄 (BAL) 中のヒアルロン酸のレベルは、一般的に 15 ng/ml 未満である。BAL 中のヒアルロン酸レベルは、呼吸困難の状態において劇的に上昇する (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加は、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防止することができる。可溶性 PH 20、例えば、本明細書において提供されるものの精製された調製物を、肺または静脈内送達のいずれかにより、このような状態を示す患者に送達し、ヒアルロン酸レベルを減少させることができる。ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性 PH 20 は、また、グリコサミノグリカンの上昇と関連する他の肺の合併症に罹患している患者に、または肺への他の共送達される分子の送達を増強するために投与することができる。

20

30

【0299】

3. 他の使用

その治療的使用のさらなる例において、ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性 PH 20、例えば、本明細書において提供される es PH 20 は、このような目的のために、壊死物質、例えば、ピンカアルカロイドの静脈傍注射由来の局所壊死に対する解毒剤として (Few et al. (1987) Amer. J. Matern. Child Nurs. 12, 23-26)、ガングリオン嚢胞の処置 (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処置 (Elder et al. (1980) Lancet 648-649) のために使用することができる。可溶性 PH 20 は、また、最も一般的な手の軟組織塊であり、皮膚の下に感知することができる液体で満たされた嚢であるガングリオン嚢胞 (手首嚢胞、聖書嚢胞または背側腱嚢胞としても知られている) を処置するために使用することができる。

40

【0300】

ヒアルロニダーゼ、例えば、可溶性 PH 20 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り脊髄損傷の処置において使用することができる。脊髄損傷後、CSPG を含むグリア性瘢痕は星状細胞により生産される。CSPG は、軸索成長の阻害において重要な役割を果たす。加えて、CSPG の発現は、中枢神経系 (CNS) の損傷後に増加することが示されている。可溶性 PH 20 は、また、化学的髄核融解術として知られるプロセスにおいて椎間板ヘルニアの処置のために利用することができる。ヒアルロニダーゼと同様の基質を開裂する酵素であるコンドロイチナーゼ A B C は、腰椎

50

における椎間板内圧の減少を誘導することができる。3タイプの椎間板損傷がある。膨隆型椎間板は、無傷であるが、膨隆しているものである。脱出型椎間板において、線維包(fibrous wrapper)は破れており、NPは漏出しているが、まだ椎間板と結合している。隔離型椎間板において、NPのフラグメントは、椎間板からはずれ、脊柱管中に遊離している。化学的髄核融解術は、一般的に、膨隆型および脱出型椎間板に対して有効であるが、隔離型椎間板損傷に対して有効ではない。

【実施例】

【0301】

I. 実施例

以下の実施例は、説明の目的のみのために含まれており、本発明の範囲を制限する意図はない。

【0302】

実施例 1

ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ-末端欠失変異体の産生

本実施例において、一連のヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ-末端欠失変異体を産生した。成熟体ヒトPH20ヒアルロニダーゼまたは精子接着分子1(SPAM1)は474個のアミノ酸を含むが、本実施例において産生された成熟カルボキシ-末端欠失変異体は472個のアミノ酸から415個のアミノ酸の長さの範囲であった。

【0303】

短縮されているヒトPH20ヒアルロニダーゼのアミノ酸A507からアミノ酸K450のカルボキシ-末端欠失変異体をコードするDNAオリゴヌクレオチドを、標準DNA合成プロトコールにしたがって合成した。親DNA配列はコドン最適化ヒトPH20ヒアルロニダーゼであった、そしてこの核酸配列は配列番号：2に記載されている。このコドン最適化ヒトPH20ヒアルロニダーゼは、配列番号：144に記載されている異種免疫グロブリンカップ(IgK)シグナル配列を含んだ。さらに、該配列は、HZ24プラスミド(配列番号：140)にクローニングできるように5'NheIおよび3'BamHI制限酵素認識部位を含んだ。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ-末端欠失変異体の核酸配列は、配列番号：146-185および199-201に記載されている。合成DNA配列をNheIおよびBamHI制限酵素で消化し、同様に消化されたHZ24プラスミドにクローニングし、それぞれの個々のクローンのために成熟SPAM1-HZ24プラスミドを産生した。

【0304】

ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ-末端欠失変異体は、表3に記載されている。SPAM1成熟体は、タンパク質のC-末端の4個のアミノ酸により同定される。前駆体および成熟体カルボキシ-末端欠失変異体のアミノ酸の長さが記載されている。

10

20

30

【表 4】

表 3. ヒト PH20 ヒアルロニダーゼのカルボキシー末端欠失変異体				
変異体	前駆体 (アミノ酸)	前駆体 配列番号	成熟体 (アミノ酸)	成熟体 配列番号
SPAM1-VASL	509	1	474	108
SPAM1-SSVA	507	3	472	55
SPAM1-IISS	505	4	470	56
SPAM1-FLII	503	5	468	57
SPAM1-LFLI	502	47	467	99
SPAM1-ILFL	501	6	466	58
SPAM1-SILF	500	48	465	100
SPAM1-VSIL	499	7	464	59
SPAM1-IVSI	498	49	463	101
SPAM1-FIVS	497	8	462	60
SPAM1-TMFI	495	9	460	61
SPAM1-SATM	493	10	458	62
SPAM1-TLSA	491	11	456	63
SPAM1-PSTL	489	12	454	64
SPAM1-STLS	490	13	455	65
SPAM1-ASPS	487	14	452	66
SPAM1-YNAS	485	15	450	67
SPAM1-FYNA	484	16	449	68
SPAM1-IFYN	483	17	448	69
SPAM1-QIFY	482	18	447	70
SPAM1-PQIF	481	19	446	71
SPAM1-EPQI	480	20	445	72

10

20

30

【表 5】

SPAM1-EEPQ	479	21	444	73
SPAM1-TEEP	478	22	443	74
SPAM1-ETEE	477	23	442	75
SPAM1-METE	476	24	441	76
SPAM1-PMET	475	25	440	77
SPAM1-PPME	474	26	439	78
SPAM1-KPPM	473	27	438	79
SPAM1-LKPP	472	28	437	80
SPAM1-FLKP	471	29	436	81
SPAM1-AFLK	470	30	435	82
SPAM1-DAFL	469	31	434	83
SPAM1-IDAF	468	32	433	84
SPAM1-CIDA	467	33	432	85
SPAM1-VCID	466	34	431	86
SPAM1-GVCI	465	35	430	87
SPAM1-DGVC	464	36	429	88
SPAM1-IADG	462	37	427	89
SPAM1-VCIA	460	38	425	90
SPAM1-VDVC	458	39	423	91
SPAM1-DAVD	456	40	421	92
SPAM1-DTDA	454	41	419	93
SPAM1-VKDT	452	42	417	94
SPAM1-ADVK	450	43	415	95

10

20

【0305】

実施例 2

ヒト PH20 ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体の発現

本実施例において、実施例 1 において産生されるヒト PH20 ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体を、CHO - S 細胞において発現させた。さらに、rHuPH20 および His - タグ PH20 を、Lec 1 (カタログナンバー CRL - 1735、ATCC)、Lec 2 (カタログナンバー CRL - 1736、ATCC)、Lec 8 (カタログナンバー CRL - 1737、ATCC) および Pro - 5 (カタログナンバー CRL - 1781) を含む、レクチン耐性 CHO 変異体の 4 つの株のそれぞれにおいて発現させた。Lec 変異細胞における PH20 の発現は、以下の実施例 9 においてさらに議論されている。

30

【0306】

A. 6 - ウェルプレートにおける CHO - S 細胞の一過性発現

実施例 1 において産生された変異 PH20 - HZ24 プラスミドを、製造業者の指示にしたがって Gene Juice (登録商標) (Novagen) を使用して、CHO - S 細胞 (チャニーズハムスター卵巣 CHO K1 細胞由来) に一過性に感染させた。手短に言えば、CHO - S 細胞を L - グルタミンを補った CHO 培地において増殖した。トランスフェクション前に、CHO - S 細胞をウェルあたり約 5×10^5 細胞で 6 - ウェルプレートに置き、37 °C で 5% CO₂ で一晩増殖した。次に培地を取り出し、CHO - S 細胞を 1 mL の無血清培地で 2 回洗浄した。Gene Juice (登録商標) を血清非含有培地と混合し、次に 2 µg の変異 - HZ24 DNA を加えた。室温で 5 - 15 分インキュベート後、Gene Juice (登録商標) / DNA 混合物を洗浄した CHO - S 細胞

40

50

を含む個々のウェルに滴下した。4時間後、培地をL-グルタミンを補った1 mLのCD-CHO培地と置き換え、細胞を37で5%CO₂で72時間インキュベートした。発現後、培地および細胞を別々に回収した。

【0307】

B. 10 cmの細胞培養皿におけるCHO細胞の一過性発現

実施例1において産生された変異PH20-HZ24プラスミドを、製造業者の指示にしたがってGene Juice (登録商標) (Novagen) を使用して、CHO-S細胞に一過性に感染させた。あるいは、HZ24-PH20 (rHuPH20をコードする配列番号: 108)、PH20shis (ヒス-タグPH20をコードする配列番号: 187) およびHZ24-mut (B/S) (アミノ酸482で短縮されたPH20をコードする配列番号: 122) を、製造業者の指示にしたがってGene Juice (登録商標) (Novagen) を使用して、Lec1 (カタログナンバーCRL-1735、ATCC)、Lec2 (カタログナンバーCRL-1736、ATCC)、Lec8 (カタログナンバーCRL-1737、ATCC) およびPro-5 (カタログナンバーCRL-1781) を含むレクチン耐性CHO変異体の4つの株に一過性に感染させた。

【0308】

手短に言えば、CHO-S細胞を8 mMのGlutaMaxを補ったCD-CHO培地において維持した。レクチン耐性CHO変異細胞を10%のFBSを補ったDMEM培地において増殖した。トランスフェクション前に、CHO細胞をウェルあたり約3 × 10⁶細胞で10 cmの細胞培養皿に置き、10%のFBSを補ったDMEM培地中で37で5%CO₂で一晩増殖した。次に培地を除去し、細胞の単層を10 mLの無血清培地で2回洗浄した。36 μLのGene Juice (登録商標) を1.2 mLのDMEMと混合し、室温で5分インキュベートした。インキュベーション後、12 μgのDNAを加え、穏やかに混合した。室温で15分インキュベーション後、Gene Juice (登録商標) / DNA混合物をCHO細胞の単層に滴下し、細胞培養皿を混合するために穏やかに振盪した。プレートを37で5%CO₂で4時間インキュベートした。4時間後、培地をGlutaMax-1を補った12 mLの界面活性剤フリーのCD-DG44培地と置き換え、細胞を37で5%CO₂で48時間インキュベートした。発現後、培地および細胞を別々に回収した。

【0309】

実施例3

ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ-末端欠失変異体の溶解度

本実施例において、上記実施例2に記載されている一過性発現後、培地および細胞を別々に回収し、ウエスタンブロット分析によりPH20発現および溶解度について分析した。C-末端切断変異体の溶解度を、発現されたタンパク質が増殖培地または細胞中に存在するか否かを調べることにより測定した。配列番号: 55-65および99-101に対応する455から472アミノ酸長のC-末端欠失変異体は、タンパク質を細胞膜に付着させるために役立つGPIアンカー由来のアミノ酸残基を含む。これらの変異体を発現する細胞を、培地への可溶性タンパク質の放出を可能にするGPIアンカーを開裂するホスホイノシトール-ホスホリパーゼC (PI-PLC) で処理し、得られた培地および細胞中のPH20の存在をウエスタンブロット分析により測定した。

【0310】

A. ウエスタンブロット分析

非還元サンプルを4-20%のトリス-グリシゲル上に置き、iBlot (Invitrogen) を使用してPVDF膜に移した。ウエスタンブロットのために、ウサギ抗-PH20 IgG (0.5 μg/mL) を一次抗体として使用し、HRP-結合ヤギ抗-ウサギIgG (0.1 ng/mL, Cat# DC03L, EMD) を二次抗体として使用した。発現の証拠は、組換えヒトPH20ヒアルロニダーゼに対応する約66 kDaでのバンドにより決定される。

【0311】

B. P I - P L C 処理

1. 6 - ウェルプレートにおける一過性発現

上記実施例 2 A に記載されている 72 時間 C H O - S 細胞における r H u P H 2 0 の発現後、培地および細胞を別々に回収した。細胞を血清非含有培地で洗浄し、次にウェルあたり 2 m L の血清非含有培地を加えた。P I - P L C (0 . 5 ユニット / ウェル) をそれぞれのウェルに加え、細胞を P I - P L C 中で 2 時間インキュベートした。得られた培地および細胞を上記のようにウエスタンブロット分析により分析した。

【 0 3 1 2 】

2. 1 0 c m の組織培養皿における一過性発現

1 つは P I - P L C で処理され、およびもう 1 つは P I - P L C で処理されない、それぞれ r H u P H 2 0 を発現する C H O - S 細胞の 2 つのプレートで、上記実施例 2 B に記載されているそれぞれの C - 末端変異体を製造した。48 時間発現後、P I - P L C で処理しなかった細胞において、培地および細胞を別々に回収した。回収した培地を沈降させ、10 m L の容量に濃縮し、A m i c o n 3 0 k D M W C O 濃縮器を使用して P B S にバッファー交換した。細胞を冷 P B S で濯ぎ、解体し、プロテアーゼ阻害剤 S e t I I I (カタログナンバー 5 3 9 1 3 4 、 C a l b i o c h e m) を有する 1 . 2 m L の P B S に再懸濁した。再懸濁した細胞を手短に超音波処理し、全細胞抽出物を調製した。細胞の P I - P L C 処理のために、発現の 48 時間後、上記のように未処理培地を回収した。細胞を G l u t a m a x - 1 を含む新鮮な C D D G 4 4 培地で 1 回濯ぎ、培地を皿あたり 3 . 0 ユニットの P I - P L C で G l u t a m a x - 1 を補った 1 2 m L の新鮮な界面活性剤フリー C D D G 4 4 培地と置き換え、細胞を 3 7 ° C で 5 % C O ₂ で 2 時間インキュベートした。2 時間後、上記のように P I - P L C 培地および細胞を別々に回収した。得られた未処理培地および細胞ならびに P I - P L C 処理培地および細胞を、上記のようにウエスタンブロット分析により分析した。

【 0 3 1 3 】

C. 結果

結果は以下の表 4 に記載されている。4 つの変異体、I L F L (配列番号 : 5 8)、S I L F (配列番号 : 1 0 0)、V S I L (配列番号 : 5 9) および I V S I (配列番号 : 1 0 1) は、P H 2 0 の低い発現を示した。ウエスタンブロット分析は、約 6 6 k D a でのタンパク質バンドにより証明されたとおり、ヒト P H 2 0 ヒアルロニダーゼの F 5 0 0 (配列番号 : 5 9 - 9 5 および 1 0 0 - 1 0 1) よりも短いカルボキシ - 末端欠失変異体が培地に発現されることを示す。ヒト P H 2 0 ヒアルロニダーゼの L 5 0 1 から A 5 0 7 でのカルボキシ - 末端欠失変異体 (配列番号 : 5 5 - 5 8 および 9 9) は細胞中に発現される。P I - P L C でこれらの細胞が処理されると、約 6 6 k D a でのタンパク質バンドにより証明されたとおり、ヒト P H 2 0 ヒアルロニダーゼを培地に放出する。配列番号 : 5 9 - 6 5 および 1 0 0 - 1 0 1 に対応するヒト P H 2 0 ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体由来の細胞の P I - P L C での処理は、これらのタンパク質が最初に培地に発現されるため、効果がなかった。

10

20

30

【表6】

表4. ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシー末端欠失変異体発現				
変異体	成熟体 (AA)	タンパク質 発現	培地に発現	PI-PLCの添加後に 培地に発現
SPAM1-VASL (配列番号:108)	474	あり	なし	あり
SPAM1-SSVA (配列番号:55)	472	あり	なし	あり
SPAM1-IISS (配列番号:56)	470	あり	なし	あり
SPAM1-FLII (配列番号:57)	468	あり	なし	あり
SPAM1-LFLI (配列番号:99)	467	あり	なし	あり
SPAM1-ILFL (配列番号:58)	466	弱い	なし	あり
SPAM1-SILF (配列番号:100)	465	弱い	弱い/あり	最初に培地
SPAM1-VSIL (配列番号:59)	464	弱い	あり	最初に培地
SPAM1-IVSI (配列番号:101)	463	弱い	あり	最初に培地
SPAM1-FIVS (配列番号:60)	462	あり	あり	最初に培地
SPAM1-TMFI (配列番号:61)	460	あり	あり	最初に培地
SPAM1-SATM (配列番号:62)	458	あり	あり	最初に培地
SPAM1-TLSA (配列番号:63)	456	あり	あり	最初に培地
SPAM1-STLS (配列番号:65)	455	あり	あり	最初に培地
SPAM1-PSTL (配列番号:64)	454	あり	あり	最初に培地
SPAM1-ASPS (配列番号:66)	452	あり	あり	n/a

10

20

30

【表 7】

SPAM1-YNAS (配列番号:67)	450	あり	あり	n/a
SPAM1-FYNA (配列番号:68)	449	あり	あり	n/a
SPAM1-IFYN (配列番号:69)	448	あり	あり	n/a
SPAM1-QIFY (配列番号:70)	447	あり	あり	n/a
SPAM1-PQIF (配列番号:71)	446	あり	あり	n/a
SPAM1-EPQI (配列番号:72)	445	あり	あり	n/a
SPAM1-EEPQ (配列番号:73)	444	あり	あり	n/a
SPAM1-TEEP (配列番号:74)	443	あり	あり	n/a
SPAM1-ETEE (配列番号:75)	442	あり	あり	n/a
SPAM1-METE (配列番号:76)	441	あり	あり	n/a
SPAM1-PMET (配列番号:77)	440	あり	あり	n/a
SPAM1-PPME (配列番号:78)	439	あり	あり	n/a
SPAM1-KPPM (配列番号:79)	438	あり	あり	n/a
SPAM1-LKPP (配列番号:80)	437	あり	あり	n/a
SPAM1-FLKP (配列番号:81)	436	あり	あり	n/a
SPAM1-AFLK (配列番号:82)	435	あり	あり	n/a

10

20

30

【表 8】

SPAM1-DAFL (配列番号:83)	434	あり	あり	n/a
SPAM1-IDAF (配列番号:84)	433	あり	あり	n/a
SPAM1-CIDA (配列番号:85)	432	あり	あり	n/a
SPAM1-VCID (配列番号:86)	431	あり	あり	n/a
SPAM1-GVCI (配列番号:87)	430	あり	あり	n/a
SPAM1-DGVC (配列番号:88)	429	あり	あり	n/a
SPAM1-IADG (配列番号:89)	427	あり	あり	n/a
SPAM1-VCIA (配列番号:90)	425	あり	あり	n/a
SPAM1-VDVC (配列番号:91)	423	あり	あり	n/a
SPAM1-DAVD (配列番号:92)	421	あり	あり	n/a
SPAM1-DTDA (配列番号:93)	419	あり	あり	n/a
SPAM1-VKDT (配列番号:94)	417	あり	あり	n/a
SPAM1-ADVK (配列番号:95)	415	あり	あり	n/a

10

20

30

【0314】

実施例 4

Triton (登録商標) X-114 アッセイを使用するヒト PH20 ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体の溶解度

本実施例において、ヒト PH20 ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体の溶解度を Triton (登録商標) X-114 アッセイを使用して試験した。このアッセイにおいて、可溶性 PH20 ヒアルロニダーゼは 37 に温められた Triton (登録商標) X-114 溶液の水相に分配するが (Bordier et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7により記載されているとおりに修飾)、膜に固定された PH20 ヒアルロニダーゼは界面活性剤リッチ相に分配する。

40

【0315】

この目的のために、PBS中の2% (v/v) の Triton (登録商標) X-114 を 0 で上記実施例 3 B で製造されるとおりの 200 μ L の組織培養培地または細胞抽出物に加え、サンプルを氷上でインキュベートした。分離のために、サンプルをマイクロチューブ中で 4 で 0.06% の Triton (登録商標) X-114 を含む 30 μ L のスクロースクッション (6% w/v) 上に覆った。相分離を誘導するためにサンプルを 37 で 3 分加熱し、4000 g で室温で 3 分遠心した。水性および界面活性剤相を SDS-PAGE 分析およびウエスタンブロット法のために取り出した。ウサギ抗-PH20 IgG (0.5 μ g/mL) を一次抗体として使用し、HRP-結合ヤギ-ウサギ IgG (0.1 ng/mL、Cat# DC03L、EMD) を二次抗体として使用した。界面活性

50

剤相に強く分配する全長ヒトPH20を対照として使用した。

【0316】

カルボキシ - 末端欠失変異体の溶解度の結果を表5に示す。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのF500までのカルボキシ - 末端欠失変異体（前駆体配列番号：7 - 13および48 - 49または成熟体配列番号：59 - 65および100 - 101）は、水相に分配し、したがって可溶性である。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのF500より長いカルボキシ - 末端欠失変異体（配列番号：55 - 58および99）は、界面活性剤相に分配し、不溶性である。全長PH20は、また、不溶性である。

【表9】

表5. ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体の溶解度			
変異体	配列番号	成熟体(AA)	可溶性
SPAM1-VASL	108	474	なし
SPAM1-SSVA	55	472	なし
SPAM1-IISS	56	470	なし
SPAM1-FLII	57	468	なし
SPAM1-LFLI	99	467	なし
SPAM1-ILFL	58	466	なし
SPAM1-SILF	100	465	あり
SPAM1-VSIL	59	464	あり
SPAM1-IVSI	101	463	あり
SPAM1-FIVS	60	462	あり
SPAM1-TMFI	61	460	あり
SPAM1-SATM	62	458	あり
SPAM1-TLSA	63	456	あり
SPAM1-PSTL	64	454	あり
SPAM1-STLS	65	455	あり

10

20

30

【0317】

実施例5

ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体のヒアルロニダーゼ活性

本実施例において、ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体を、ビオチン化 - ヒアルロン酸（ビオチン化 - HAまたはbHA）を用いたマイクロタイターアッセイを使用して、それらのPH20ヒアルロニダーゼ活性について試験した。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体を、pH7.4およびpH5.5の両方でヒアルロニダーゼ活性について試験した。

【0318】

手短に言えば、4 × BHX 96 - ウェルプレートにビオチン化 - HA（1.1MDa）で被覆した。トランスフェクション72時間後、ヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体でトランスフェクトされた細胞由来の上清を、pH7.4またはpH5.5のいずれかでバッファーで希釈し、プレートの個々のウェルに加え、37°Cで90分インキュベートした。反応を4MのグアニジンHClの添加により終結させた。ウェルをTween 20（PBST）を有するリン酸緩衝生理食塩水で4回洗浄し、消化されたすべてのビオチン化 - HAを取り出し、次に室温で1時間でストレプトアビジン - HRPを加えた。ウェルをPBSTで4回洗浄し、プレートをTMBで発色させた。プレートをELISAプレートリーダーを使用して450nmで読んだ。ヒアルロニダーゼ活性（ユニット/mL）を、ヒアルロニダーゼ参照標準曲線を用いて450nmでの測定される吸光度を補間することにより決定した。全長成熟体ヒトPH20ヒアルロニダーゼおよ

40

50

び非トランスフェクトCHO細胞を陽性および陰性対照として使用した。

【0319】

結果を以下の表6および6Aに示す。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのSPAM1 - G D V CからSPAM1 - A D V K (配列番号: 88 - 95)に対応するI430より短いカルボキシ - 末端欠失変異体は不活性である。ヒトPH20ヒアルロニダーゼのI498 (配列番号: 101)、L499 (配列番号: 59)、F500 (配列番号: 100)、L501 (配列番号: 58)およびI502 (配列番号: 99)で終わるカルボキシ - 末端欠失変異体は、低い発現レベルによってわずかに検出可能な活性を有する。他のすべてのヒトPH20ヒアルロニダーゼのカルボキシ - 末端欠失変異体 (配列番号: 55 - 57 および60 - 87) は、pH7.4およびpH5.5の両方で活性なヒアルロニダーゼである。

【表 10】

表 6. ヒアルロニダーゼ活性				
欠失変異体	前駆体 (AA)	成熟体 (AA)	pH7.4 活性 (ユニット/ml)	pH5.5 活性 (ユニット/ml)
SPAM1-SSVA (配列番号:55)	507	472	1.4715	1.125
SPAM1-IISS (配列番号:56)	505	470	1.458	0.837
SPAM1-FLII (配列番号:57)	503	468	0.9405	0.6345
SPAM1-ILFL (配列番号:58)	501	466	0.0405	0.0405
SPAM1-VSIL (配列番号:59)	499	464	0.02025	0.045
SPAM1-FIVS (配列番号:60)	497	462	0.1755	0.216
SPAM1-TMFI (配列番号:61)	495	460	0.45	0.612
SPAM1-SATM (配列番号:62)	493	458	0.5715	0.7335
SPAM1-TLSA (配列番号:63)	491	456	0.3645	0.5625
SPAM1-STLS (配列番号:65)	490	455	0.819	1.2375
SPAM1-PSTL (配列番号:64)	489	454	1.557	1.089
SPAM1-ASPS (配列番号:66)	487	452	1.017	0.9225
SPAM1-YNAS (配列番号:67)	485	450	1.8765	1.74825
SPAM1-FYNA (配列番号:68)	484	449	1.4985	1.26225
SPAM1-IFYN (配列番号:69)	483	448	2.45025	2.3085
SPAM1-QIFY (配列番号:70)	482	447	2.03175	1.647
SPAM1-PQIF (配列番号:71)	481	446	1.818	1.701
SPAM1-EPQI (配列番号:72)	480	445	2.1825	1.6425

10

20

30

40

【表 1 1】

SPAM1-EEPQ (配列番号:73)	479	444	1.917	2.0745
SPAM1-TEEP (配列番号:74)	478	443	1.764	1.584
SPAM1-ETEE (配列番号:75)	477	442	2.088	2.0475
SPAM1-METE (配列番号:76)	476	441	1.332	1.278
SPAM1-PMET (配列番号:77)	475	440	2.223	2.0925
SPAM1-PPME (配列番号:78)	474	439	1.2105	1.341
SPAM1-KPPM (配列番号:79)	473	438	0.8595	0.91575
SPAM1-LKPP (配列番号:80)	472	437	0.5445	0.9
SPAM1-FLKP (配列番号:81)	471	436	3.321	2.79
SPAM1-AFLK (配列番号:82)	470	435	3.204	2.925
SPAM1-DAFL (配列番号:83)	469	434	2.3895	2.2365
SPAM1-IDAF (配列番号:84)	468	433	0.5625	0.62775
SPAM1-CIDA (配列番号:85)	467	432	0.5535	0.4725
SPAM1-VCID (配列番号:86)	466	431	0	0.2115
SPAM1-GVCI (配列番号:87)	465	430	0.441	0.468
SPAM1-DGVC (配列番号:88)	464	429	0	0.045
SPAM1-IADG (配列番号:89)	462	427	0	0.00225

10

20

30

【表 1 2】

SPAM1-VCIA (配列番号:90)	460	425	0	0.0135
SPAM1-VDVC (配列番号:91)	458	423	0.0495	0.0585
SPAM1-DAVD (配列番号:92)	456	421	0	0.0675
SPAM1-DTDA (配列番号:93)	454	419	0	0.054
SPAM1-VKDT (配列番号:94)	452	417	0.054	0.0225
SPAM1-ADVК (配列番号:95)	450	415	0.063	0.0405
VASL (配列番号:108)	509	474	1.8045	0.891
VASL + PLC (配列番号:108)	509	474	3.96	2.313
HZ24-PH20 (配列番号:109)	482	447	0.499	0.726188
CHO-S	n/a	n/a	0	0.012375

10

20

【 0 3 2 0 】

【表 13】

表 6 A. ヒアルロニダーゼ活性				
欠失変異体	前駆体 (AA)	成熟体 (AA)	pH7.4 活性 (ユニット/ml)	pH5.5 活性 (ユニット/ml)
SPAM1-SSVA (配列番号:55)	507	472	1.782	1.256
SPAM1-IISS (配列番号:56)	505	470	1.863	0.932
SPAM1-FLII (配列番号:57)	503	468	1.094	0.648
SPAM1-LFLI (配列番号:99)	502	467	0.608	0.324
SPAM1-ILFL (配列番号:58)	501	466	0.446	0.122
SPAM1-SILF (配列番号:100)	500	465	0.365	0.162
SPAM1-VSIL (配列番号:59)	499	464	0.486	0.122
SPAM1-IVSI (配列番号:101)	498	463	0.527	0.203
SPAM1-FIVS (配列番号:60)	497	462	0.365	0.162
SPAM1-TMFI (配列番号:61)	495	460	0.689	0.770
SPAM1-SATM (配列番号:62)	493	458	0.689	0.851
SPAM1-TLSA (配列番号:63)	491	456	0.851	0.729
SPAM1-PSTL (配列番号:64)	489	454	1.985	3.321
SPAM1-ASPS (配列番号:66)	487	452	1.134	1.580

10

20

30

【0321】

実施例 6

LC-MSによるrHuPH20のグリカン分析

本実施例において、rHuPH20(配列番号:122)のグリカン分析試験をトリプシン消化PH20の質量スペクトル分析により行った。

40

【0322】

簡潔には、rHuPH20(実施例15Cで生産されるとおりの)を凍結乾燥し、6MのグアニジンHCL、0.002MのEDTAおよび0.02MのTris、pH8.28を含むバッファーで0.5mg/mLの最終濃度に再懸濁した。DTT(10mMの最終濃度)を加え、タンパク質/DTT混合物を37で1時間インキュベートした。還元後、ヨードアセトアミドを20mMの最終濃度に加えた。最後に、トリプシン(1:25w/w)を加え、混合物を37で20時間インキュベートした。

【0323】

トリプシン消化物をLC-MSにより分析した。簡潔には、トリプシン消化物を以下の表7に記載されている条件を使用するC18逆相カラムに注入した。MSデータを陽性イ

50

オンモードにおけるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を使用して Q-TOF Ultima 質量分析計で回収した。データを MS モードにおける m/z 200 - 1950 から得た。糖ペプチドを GlycoMod ソフトウェア (www.expasy.ch/tools/glycomod/) を使用して分析し、グリカン型を決定した。

【表 14】

パラメーター	設定		
カラム	Phenomenex Synergi Hydro-RP		
カラム温度	30 °C		
移動相 A	0.2% のギ酸を含む脱イオン水		
移動相 B	0.2% のギ酸を含むアセトニトリル		
勾配	時間 (分)	% A	% B
	0.0	97.0	3.0
	5.0	97.0	3.0
	144.0	60.0	40.0
	150.0	10.0	90.0
	160.0	10.0	90.0
	180.0	97.0	3.0
流速	0.2 mL / 分		
注入容量	5 μ L		
稼働時間 (全)	180 分		

【0324】

ヒト PH20 ヒアルロニダーゼは、T475 に 1 つの O-グリコシル化部位を有する。該部位は 1 または 2 個のシアル酸を有する核型 1 グリカンにより占有される。rHuPH20 は、N82、N166、N235、N254、N368 および N393 を含む 6 つの異なるアスパラギン残基でグリコシル化される。結果は、N254 が約 75% 占有され、N393 が約 85% 占有され、N82、N166、N235 および N368 の残りの 4 つの部位が 99% 以上占有されることを示す。高マンノース、ハイブリッドおよび複合型の全 3 つの型の N-グリカンが rHuPH20 に存在する。一般的に、rHuPH20 は、約 45% の高マンノースグリカン、45% の複合型グリカンおよび 10% のハイブリッドグリカンを含む。全グリカンの約 35% はアニオン性であり、その 25% はシアル酸を含み、残りの 10% は未知のアニオン性基、恐らくリン酸基を含む。多数の複合型グリカンはフコシル化されており、アニオン性複合型グリカンは、ほとんど 1 個のシアル酸を含むが、それらの一部は 2 個のシアル酸を含む。それぞれのアスパラギン残基は、N235 を除いて、約 90% が 1 つの型のグリカン を有し、少ない割合で他の 2 つの型のグリカンを有する。それぞれの残基に対する主要なグリカン型は、以下の表 8 に記載されている。残基 N82、N166 および N254 は、複合型グリカンにより占有される。残基 N368 および N393 は、高マンノースグリカンにより占有される。残基 N235 は、約 80% の高マンノースグリカンと約 20% の複合型グリカンにより占有される。

【表 15】

表 8. rHuPH20 におけるアスパラギン残基のN-グリカンの型		
グリカン部位	高マンノースグリカン	複合型グリカン
N 8 2		X
N 1 6 6		X
N 2 3 5	~ 8 0 %	~ 2 0 %
N 2 5 4		X
N 3 6 8	X	
N 3 9 3	X	

10

【 0 3 2 5 】

実施例 7

エンドグリコシダーゼでの処理によるヒトPH20ヒアルロニダーゼの脱グリコシル化

本実施例において、ヒトPH20ヒアルロニダーゼを、精製されたrHuPH20（配列番号：122）の種々のグリコシダーゼでの処理により脱グリコシル化し、ヒアルロニダーゼ活性を評価した。ヒトPH20ヒアルロニダーゼは、N82、N166、N235、N254、N368およびN393を含む6つの異なるアスパラギン残基でグルコシル化される。すべてのN-グリカンを開裂するPNGaseF（New England Biolabs, Cat. No. P0704S, Lot #34）；高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを開裂するEndoF1；二分岐複合型グリカンを開裂するEndoF2；二以上の分岐複合型グリカンを開裂するEndoF3；および高マンノースおよびハイブリッド型グリカンを開裂するEndoH（New England Biolabs, Cat. No. P0702S）を含む5つのグリコシダーゼを、脱グリコシル化されたヒトPH20ヒアルロニダーゼを生産するために使用した。したがって、PNGaseFでの処理は完全脱グリコシル化をもたらすが、エンドグリコシダーゼでの処理は部分的脱グリコシル化のみをもたらす。

20

【 0 3 2 6 】

完全脱グリコシル化について、精製されたrHuPH20（0.1mg/mLの最終濃度）を、37で一晚50mMのリン酸バッファーpH7.2中で、PNGaseF（50,000ユニット/mL）とインキュベートした。部分的脱グリコシル化について、精製されたrHuPH20（0.5mg/mLの最終濃度）を、35で一晚50mMの酢酸ナトリウムバッファーpH5.0中で、0.3ユニット/mLのエンドグリコシダーゼ（EndoF1、EndoF2、EndoF3またはEndoHのいずれか）または全4つのエンドグリコシダーゼの混合物とインキュベートした。rHuPH20の脱グリコシル化をSDS-PAGEによるPH20の移動度の変化により分析した。ヒアルロニダーゼ酵素活性を実施例5に記載されているとおりに測定した。

30

【 0 3 2 7 】

ヒトPH20ヒアルロニダーゼは、約66kDaの分子量を有する。EndoF1、EndoHまたはEndoF1、EndoF2、EndoF3およびEndoHの混合物での処理は、約56kDaの分子量へのSDS-PAGE移動度シフトにより測定されたとおり、部分的に脱グリコシル化されたヒトPH20ヒアルロニダーゼをもたらした。PNGaseFでの処理は、ヒトPH20ヒアルロニダーゼの完全脱グリコシル化をもたらした。rHuPH20の部分的脱グリコシル化は、ヒアルロニダーゼ酵素活性の不活性化をもたらさなかったが、N-グリカンを完全に除去するためのPNGaseFでの包括的消化は、ヒアルロニダーゼ酵素活性の全喪失をもたらした（以下の表9参照）。

40

【表 16】

rHuPH20 (U/ml)	対照 PH20	EndoF1	EndoF2	EndoF3	EndoH	EndoF1, F2,F3,H	PNGaseF
1.0000	0.3195	0.2983	0.2573		0.2965	0.2144	1.9315
0.2000	0.7910	0.7656	0.6048	0.5880	0.7435	0.5366	1.9173
0.0400	1.4299	1.3450	1.3117	1.2255	1.3584	1.3877	1.9926
0.0080	1.8397	1.7338	1.6900	1.6698	1.6998	1.8418	1.9172

10

【0328】

実施例 8

ヒト PH20 ヒアルロニダーゼのグリコシル化阻害剤での処理

本実施例において、rHuPH20 (配列番号: 122) を 2 つのグリコシル化阻害剤のそれぞれの存在下で一過性に発現させ、ヒアルロニダーゼ分泌および活性を評価した。キフネンシンは、グリカンプロセッシングに関連する酵素である強力な阻害剤マンノシダーゼ I である (例えば、Elbein et al., J Biol Chem, 265:15599-15605 (1990) 参照)。ツニカマイシンは、酵素 GlcNAc ホスホ - トランスフェラーゼ (GPT) を阻害し、それによりすべての N - グリカンの合成を妨げる相同ヌクレオシド抗生物質の混合物である (例えば、Boehme et al., Eur. J. Biochem. 269:977-988 (2002) 参照)。

20

【0329】

簡潔には、 1×10^6 個の rHuPH20 を発現する HZ24 - 2B2 細胞 (以下の実施例 14 参照) を 2 つの 125 mL フラスコ中の 24 mL の完全 CD - CHO 培地に播種した。ツニカマイシン (DMSO に溶解させる) またはキフネンシン (新たに水に溶解させる) を $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の最終濃度に加えた ($12 \mu\text{L}$ の DMSO を含む)。対照として、1 つのフラスコに 1×10^6 個の rHuPH20 を発現する HZ24 - 2B2 細胞を播種し、 $12 \mu\text{L}$ の DMSO をビヒクル対照として加えた。ツニカマイシンまたはキフネンシンのいずれかの添加後、細胞を 37°C で 5% の CO_2 で 4 - 6 時間インキュベートした。発現後、2 mL の培養物を取り出し、 500g で 5 分遠心した。上清を 4°C で保存し、細胞ペレットを -20°C で保存した。残りの 22 mL の培養物を 500g で 5 分遠心した。上清を 4°C で保存した。細胞を元の 2 つの 125 mL フラスコ中の 22 mL の完全 CD - CHO 培地に再懸濁した。ツニカマイシンまたはキフネンシンを $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の最終濃度で培養物に加え、細胞を 37°C で 5% の CO_2 でインキュベートした。2 mL の培養物を、培地交換後約 24 時間毎にそれぞれのフラスコから取り出した。それぞれの時点について、上清を 4°C で保存し、細胞ペレットを -20°C で保存した。rHuPH20 の発現をウエスタンブロット分析により分析し、ヒアルロニダーゼ活性をビオチン化 HA 酵素的アッセイを使用して測定した (上記実施例 3 および 5 に記載されているとおり)。

30

【0330】

結果を、生存細胞の数および PH20 活性を記載している以下の表 10 - 13 に示す。表 10 - 11 に示されるとおり、ツニカマイシンは、組織培養培地および細胞内両方の PH20 活性を阻害し、また、細胞生存能力の完全な喪失をもたらす。さらに、ツニカマイシンでの 1 時間の処理は、細胞ペレット画分における約 56kDa の分子量への SDS - PAGE 移動度シフトにより測定されるとおり、細胞内部の脱グリコシル化されたヒト PH20 ヒアルロニダーゼの蓄積をもたらす。表 12 - 13 に示されるとおり、キフネンシンは PH20 の活性に影響しなかったが、ウエスタンブロット分析は、キフネンシンが処理細胞における rHuPH20 の発現および分泌を阻害することを示した。

40

【表 17】

表 10. 組織培養培地における細胞生存能力およびPH20活性に対するツニカマイシンの効果				
時間 (時)	ツニカマイシン有り		ツニカマイシン無し	
	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)
0	1.04	0.50	1.04	0.00
1	1.04	2.80	1.04	1.50
2	1.04	5.00	1.04	3.00
4	0.910	8.80	1.30	7.00
25	1.08	5.80	1.32	82.50
49	0.200	6.80	2.72	171.30
73	0.080	7.80	3.80	331.00
91	0	7.50	6.25	313.30

10

【表 18】

表 11. 細胞ペレットにおける細胞生存能力およびPH20活性に対するツニカマイシンの効果				
時間 (時)	ツニカマイシン有り		ツニカマイシン無し	
	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)
0	1.04	34.50	1.04	35.00
1	1.04	38.00	1.04	38.10
2	1.04	34.00	1.04	36.60
4	0.910	18.00	1.30	31.90
25	1.08	1.00	1.32	14.40
49	0.200	0.80	2.72	33.10
73	0.080	0.30	3.80	67.50
91	0	0.30	6.25	79.40

20

30

【表 19】

表 12. 組織培養培地における細胞生存能力およびPH20活性に対するキフネンシンの効果				
時間 (時)	キフネンシン有り		キフネンシン無し	
	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)
0	1	0.4	1	0.45
6	1	23.85	1	15.75
24	1.2	129.6	1.4	75.6
50	2.1	299.7	2.4	206.55
72	3	535.95	4.4	444.15
96	3.7	945	6.3	726.3
144	5.8	2968.65	8.5	2241

40

【表 2 0】

時間 (時)	キフネンシソ有リ		キフネンシソ無シ	
	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)	生存細胞 ($\times 10^6$)	PH20活性 (U/mL)
0	1	22.25	1	23
6	1	21.25	1	27
24	1.2	27.75	1.4	14.45
50	2.1	43	2.4	26
72	3	98.75	4.4	52.75
96	3.7	208.75	6.3	167.5
144	5.8	497.25	8.5	107

10

【 0 3 3 1】

実施例 9

レクチン耐性 C H O 変異体における r H u P H 2 0 の一過性発現

本実施例において、r H u P H 2 0 を 4 つのレクチン耐性 C H O 変異体において一過性に発現させ、ヒアルロニダーゼ分泌および活性を評価した。レクチン耐性 C H O 変異体は、以下の表 1 4 に要約されている。P r o⁻5 細胞は、ガラクトシル化 N - グリカンにおける還元を引き起こすガラクトシルトランスフェラーゼ β 4 g a l T - 6 を欠いている（例えば、Lee et al. J. Biol. Chem. 276:13924-13934 (2001) 参照）。L e c 1 細胞は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 活性を欠き、したがって複合体型またはハイブリッドグリカンを合成しない（例えば、Chen and Stanley, Glycobiology, 13:43-50 (2003) 参照）。L e c 2 および L e c 8 は、E R またはゴルジ膜を通して糖ヌクレオチドを輸送する糖ヌクレオチド輸送体を欠いている。L e c 2 細胞は、C M P - シアル酸（すなわち、C M P - N e u A c）の位置を変えることができず、したがってアシアロ細胞表面の発現を引き起こす（例えば、Eckhardt et al., J. Biol. Chem. 273:20189-20195 (1998) 参照）。L e c 8 細胞は、U D P - ガラクトースの位置を変えることができず、したがってガラクトースを欠いているグリカンを引き起こす（例えば、Bakker et al., Glycobiology, 15:193-201 (2005) 参照）。

20

30

【表 2 1】

C H O 系	生化学的変化	遺伝子変化
P r o ⁻ 5 (親)	↓ N - グリカンにおける G a l	β 4 g a l t 6 の発現無し
L e c 1	↓ G l c N A c - T I	M g a t 1 O R F における挿入 / 欠失
L e c 2	↓ C M P - シアル酸 ゴルジトランスポーター	S l c 3 5 a 1 O R F における変異
L e c 8	↓ U D P - G a l ゴ ルジトランスポーター	S l c 3 5 a 2 O R F における変異

40

【 0 3 3 2】

簡潔には、P H 2 0 s H i s (ヒス - タグ P H 2 0 をコードする、配列番号 : 1 8 7) を、上記実施例 2 A に記載されている L e c 1 (カタログナンバー C R L - 1 7 3 5、A T C C)、L e c 2 (カタログナンバー C R L - 1 7 3 6、A T C C)、L e c 8 (カタ

50

ログナンバー CRL - 1737、ATCC) および Pro-5 (カタログナンバー CRL - 1781) を含むレクチン耐性 CHO 変異体の 4 つの株のそれぞれにおいて発現させた。さらに、HZ24-mut(B/S) (アミノ酸 482 で PH20 短縮をコードする、配列番号: 122) は、Pro-5 細胞において一過性に発現され、陰性対照として、Pro-5 細胞は mock トランスフェクションに付した。得られた細胞培養培地をウエスタンブロット分析により分析し、ヒアルロニダーゼ活性をビオチン化 HA 酵素的アッセイを使用して測定した (上記実施例 3 および 5 に記載されているとおり)。

【0333】

結果は、約 66 kDa のタンパク質バンドにより証明されるとおり、Lec 変異体において発現される rHuPH20 が培地に分泌されることを示す。bHA 酵素的アッセイの結果は、レクチン耐性 CHO 変異体、細胞をトランスフェクトするために使用されたプラスミドをコードする PH20、ならびに 1:27 および 1:81 の両方の希釈物における pH5.5 での PH20 活性を記載している以下の表 15 に記載されている。Lec 変異細胞により発現される rHuPH20 は、酵素的に活性である。

【表 22】

表 15. Lec 変異細胞において一過性に発現される rHuPH20 の PH20 活性 (U/mL)						
レクチン変異体	Pro-5	Pro-5	Lec1	Lec2	Lec8	Pro-5
プラスミド	HZ24-mut(B/S)	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	HZ24-PH20sHis	Mock トランスフェクション
PH20活性 (1:27)	0.6615	0.297	0.54	0.675	0.2565	0.081
PH20活性 (1:81)	1.1745	0.6075	0.7695	1.053	0.567	0.1215

【0334】

実施例 10

ヒト PH20 ヒアルロニダーゼ N-グリコシル化部位の部位特異的変異誘発

本実施例において、N-グリカン部位に特異的なヒト PH20 ヒアルロニダーゼの脱グリコシル化された変異体を産生し、それらの分泌パターンおよびヒアルロニダーゼ酵素活性を評価した。N-グリカン部位に特異的な脱グリコシル化された変異体およびグリカン型は、以下の表 16 に記載されている。

【0335】

PH20sHis (配列番号: 210) を、QuickChange (登録商標) 部位特異的変異誘発キット (カタログナンバー 200518、Stratagene) を使用する、それぞれのアスパラギン残基のアラニンへの変異誘発のための鋳型として使用した。鋳型 DNA によってコードされるタンパク質は、アミノ酸 S490 後にヘキサHisタグ (配列番号: 142) を含むヒト PH20 クローンである PH20sHis (配列番号: 187) に対応する。野生型 PH20sHis および脱グリコシル化された変異体は、表 16 に記載されている。N-グリコシル化部位のそれぞれに対して 1 つの 6 つの単一変異体を産生した。さらに、3 つの二重変異体および 1 つの三重変異体を、すべてが複合型グリカンにより占有されるアスパラギン N82、N166 および N254 に対して産生した。最後に、高マンノースグリカンを欠いている二重変異体 N368A/N393A を産生した。変異体を CHO-S 細胞にトランスフェクトし、発現を実施例 2A に記載されているとおりに実施した。培地への分泌およびヒアルロニダーゼ活性を上記実施例 3 および 5 に記載されているとおりに測定した。

【0336】

結果を、変異、グリカン型、タンパク質が培地に分泌されるか否かならびに pH 5.5 および pH 7.4 の両方でのヒアルロニダーゼ活性を示す以下の表 16 に示す。ウエスタンブロット分析は、残基 N82、N166、N235 および N254 の変異が培地への rHuPH20 タンパク質の分泌に影響しなかったことを示した。あるいは、残基 N368A および N368A/N393A の変異は、培地中の約 66 kDa のタンパク質の欠乏により証明されるとおり、PH20 発現および分泌を妨げた。残基 N393A の変異はタンパク質発現の減少をもたらしたが、rHuPH20 は、約 66 kDa のタンパク質バンドにより証明されるとおり、培地において観察された。残基 N82、N166 および / または N254 の変異は、rHuPH20 活性に影響しなかった。これらの残基は、複合型グリカンにより占有される。対照的に、高マンノースグリカンを含む残基 N235、N368 および / または N393 の変異は、分泌の欠乏による培地中の検出可能な活性の完全な喪失をもたらした。

【表 23】

変異体	配列番号	グリカン型	分泌	活性 pH5.5	活性 pH7.4
PH20sHis(親)	187	両方	あり	あり	あり
N82A	202	複合体型	あり	あり	あり
N166A	203	複合体型	あり	あり	あり
N235A	204	高マンノース (80%) 複合体型 (20%)	あり	なし	なし
N254A	205	複合体型	あり	あり	あり
N368A	188	高マンノース	なし	なし	なし
N393A	189	高マンノース	あり (弱い)	なし	なし
N82A/N166A	206	複合体型	あり	あり	あり
N82A/N254A	207	複合体型	あり	あり	あり
N166A/N254A	208	複合体型	あり	あり	あり
N82A/N166A/N254A	209	複合体型	あり	あり	あり
N368A/N393A	190	高マンノース	なし	なし	なし

【0337】

抗-PH20 抗体での CHO 細胞の免疫蛍光分析を、N-グリカン部位で特異的に脱グリコシル化された変異体 N368A、N393A および N368A/N393A の発現を視覚化するために使用した。CHO 細胞を、10% のウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 1 ml あたり 2.5×10^4 細胞で、200 μ L の細胞を有する 8-ウェルチャンバースライド上に単層培養のために播種し、5% の CO₂ の加湿雰囲気中で 37 °C で増殖した。細胞を、以下のとおりのリポフェクタミンTM 2000 (Invitrogen) を使用して、80% コンフルエンスで 36 時間後トランスフェクトした。DNA (血清なしで 50 μ L の DMEM 中で 0.4 μ g) およびリポフェクタミンTM 2000 (血清なしで DMEM 中で 1 μ L) を室温で 20 分穏やかに混合し、次に細胞および 100 μ L の無血清培地を含むそれぞれのウェルに加えた。混合物を、プレートの裏および外を穏やかに振盪することにより得た。次に、細胞を 37 °C で CO₂ インキュベーター中で 4-6 時間インキュベートし、その後、培地を 10% の FBS を含む培地と置き換えた。トランスフェクション 48 時間後、チャンバースライド上の細胞を 4% のパラホルムアルデヒドで 15 分で固定した。細胞を PBS で 3 回洗浄し、200 μ L の 1%

のNP-40/PBS溶液を加え、室温で30分インキュベートした。細胞をPBSで3回洗浄し、免疫標識前に4℃で保存した。

【0338】

細胞を免疫標識するため、サンプルを室温で30分、15%の正常ヤギ血清で阻止した。細胞を、PBS中の5%の正常ヤギ血清で希釈した抗-PH20ウサギIgGの1:20溶液と2時間インキュベートした。最後に、細胞をPBSで3回洗浄し、次にFITC-結合ヤギ抗-ウサギIgGと1時間インキュベートし、次に視覚化した。加えて、取付け溶液は、核染色を可能にするDAPIを含んだ。抗-PH20抗体を使用する免疫蛍光分析は、N368AおよびN393A変異がPH20を細胞内部に蓄積させることを示した。

10

【0339】

N-グリコシル化試験の要約

上記実施例7-10に示されているとおり、N結合型グリコシル化は、rHuPH20の適当なフォールディングおよび酵素活性のために不可欠である。PNGaseFでの包括的消化により、またはツニカマイシンでの処理による生合成中のグリコシル化の阻害によりもたらされるrHuPH20の完全脱グリコシル化は、全ての検出可能な酵素活性をなくした。加えて、グリコシル化されていないrHuPH20は細胞中に蓄積することを示す。対照的に、キフネンシンでの処理により、またはLeC変異体における発現によりもたらされる部分的に脱グリコシル化されているrHuPH20は、酵素活性を維持した。最後に、部位特異的変異誘発を使用する詳細な変異分析は、高マンノース型グリカンの存在が可溶性で、酵素的に活性なrHuPH20の生産のために必要であることを示した。

20

【0340】

実施例11

可溶性rHuPH20を発現する細胞系の産生

HZ24プラスミド(配列番号:140に記載されている)を使用して、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)にトランスフェクトした(例えば、米国特許出願第10,795,095、11/065,716および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)、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:110)、ECMVウイルス由来の内部リボソーム侵入部位(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、ベータ-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前初期エンハンサー/プロモーター領域(CMV)、キメライントロンおよびSV40後期ポリアデニル化シグナル(SV40)を含む。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:107に記載されているヒト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後に終始コドン、次にBamHI制限酵素認識部位を含む。したがって、構築物pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa(HZ24)は、内部リボソーム侵入部位(IRES)により分離されている、ヒトPH20のアミノ酸1-482(配列番号:109に記載されている)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:141に記載されている)をコードするCMVプロモーターにより駆動される単一のmRNA種をもたらす。

30

40

【0341】

4mM グルタミンおよび18ml/L Plurionic F68/L (Gibco)を補った、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とうフラスコ中に 0.5×10^6 細胞/mlで播種した。細胞を、120rpmで振とうし

50

ながら、加湿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前に生存能力について試験した。

【0342】

非トランスフェクトDG44 CHO細胞培養物の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、pH7.0、274 mM NaCl、10 mM KCl、1.4 mM Na₂HPO₄、12 mM デキストロース)中に2×10⁷細胞の密度に再懸濁した。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(Cla I (New England Biolabs)で一晩消化により直線化された)を加え、細胞/DNA溶液を室温で0.4 cm gap BTX (Gentronics)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を使用せずに実施した。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のコンデンサー放電でエレクトロポレーションを行った。

10

【0343】

細胞をエレクトロポレーション後にキューベットから取り出し、5 mLの4 mM グルタミンおよび18 ml/L Plurionic F68/L (Gibco)を補ったDHFR(-)細胞のための改変CD-CHO培地に移し、加湿インキュベーター中5% CO₂中37℃で2日間、選択なしで6ウェル組織培養プレートのウェル中で増殖させた。

20

【0344】

エレクトロポレーションの2日後、0.5 mLの組織培養培地をそれぞれのウェルから取り出し、実施例12に記載されてい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試験した。結果を表17に示す。

【表24】

表17. トランスフェクションの40時間後のHZ24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 ユニット/mL
トランスフェクション1 330 V	1対10	0.25
トランスフェクション2 350 V	1対10	0.52
陰性対照	1対10	0.015

30

【0345】

トランスフェクション2(350 V)の細胞を組織培養ウェルから回収し、カウントし、1 mLあたり1×10⁴から2×10⁴個の生存細胞に希釈した。細胞懸濁液の0.1 mLのアリコートを、5つの96ウェル丸底組織培養プレートの各ウェルに移した。4 mM GlutaMAX™-1サプリメント(GIBCO™、Invitrogen Corporation)を含み、ヒポキサンチンおよびチミジンサプリメントを含まない100マイクロリットルのCD-CHO培地(GIBCO)を細胞を含むウェルに加えた(最終容量0.2 mL)。

40

【0346】

10個のクローンを、メトトレキサートを含まない増殖させた5枚のプレートから同定した(表18)。

【表 2 5】

プレート／ウェル I D	相対ヒアルロニダーゼ
1 C 3	2 6 1
2 C 2	2 6 1
3 D 3	2 6 1
3 E 5	2 4 3
3 C 6	1 7 4
2 G 8	1 0 3
1 B 9	3 0 4
2 D 9	2 7 3
4 D 1 0	3 0 2

10

【 0 3 4 7】

6つのH Z 2 4クローンを培養で拡大し、単一の細胞懸濁液として振とうフラスコに移した。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個の細胞で出発し、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置いた。希釈したクローンを、ウェルあたり5 0 0個の非トランスフェクトD G 4 4 CHO細胞のバックグラウンド中で増殖させ、培養中最初の数日間に必要な増殖因子を提供した。サブクローンあたり1 0枚のプレートを作製し、そのうち5枚のプレートは5 0 n Mメトトレキサートを含み、5枚のプレートはメトトレキサートを含まない。

20

【 0 3 4 8】

クローン3 D 3から2 4個の眼に見えるサブクローンを生産した(メトトレキサート処理なしから1 3個、および5 0 n Mの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、有意なヒアルロニダーゼ活性が測定され(> 5 0ユニット/mL)、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ー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のメトトレキサート中でさらに拡大し、振とうフラスコ中で1 , 0 0 0ユニット/mL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)。次に、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。

30

【 0 3 4 9】

実施例 1 2

可溶性 r H u P H 2 0 のヒアルロニダーゼ活性の測定

細胞培養物、精製画分および精製溶液のような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測定した。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)と共に一定期間(1 0分)インキュベートし、次に酸性血清アルブミンの添加で未消化のヒアルロン酸ナトリウムを沈殿させることにより測定される。得られたサンプルの濁度を、3 0分の発生期間の後、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で作製された校正曲線を使用して実施され、サンプル活性測定はこの校正曲線と比較して行われる。

40

【 0 3 5 0】

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

50

溶解し、0.2 mLの25% Buminate溶液を混合物に希釈し、30秒間ボルテックス処理することにより調製した。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/mLに希釈した。一般的に、工程あたりの最大希釈は1:100を超えず、第1の希釈のための最初のサンプルサイズは20 µL未満ではなかった。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、FPLC画分：80 µL；組織培養上清：1 mL；濃縮物質80 µL；精製または最終工程物質：80 µLであった。希釈は、低タンパク質結合96-ウェルプレート中でトリプリケートで行い、30 µLの各希釈物をOptilux黒色/透明底プレート(BD BioSciences)に移した。

【0351】

2.5 U/mLの濃度を有する既知の可溶性rHuPH20の希釈物を、酵素希釈溶液で調製して標準曲線を作成し、Optiluxプレートにトリプリケートで加えた。希釈は、0 U/mL、0.25 U/mL、0.5 U/mL、1.0 U/mL、1.5 U/mL、2.0 U/mLおよび2.5 U/mLを含んだ。60 µLの酵素希釈溶液を含む「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。次に、プレートをカバーし、37 °Cで5分間ヒートブロック上で加温した。カバーを取り、プレートを10秒間振とうした。振とう後、プレートをヒートブロックに戻し、MULTIDROP 384 Liquid Handling装置に、加温0.25 mg/mLのヒアルロン酸ナトリウム溶液(100 mgのヒアルロン酸ナトリウム(LifeCore Biomedical)を20.0 mLのSWFIに溶解することにより調製した)を入れた。これを、2-8 °Cで2-4時間または完全に溶解するまで、穏やかに回転および/または振動することにより混合した。反応プレートをMULTIDROP 384に移し、30 µLのヒアルロン酸ナトリウムを各ウェルに分配するための起動キーを押すことにより反応を開始した。次に、プレートをMULTIDROP 384から回収し、10秒間振とうし、交換されたプレートカバーを有するヒートブロックに移した。プレートを37 °Cで10分間インキュベートした。

【0352】

MULTIDROP 384を、機械に血清作業溶液を入れ、240 µLに溶液設定を変更することにより反応を停止するように調製した。(500 mMの酢酸バッファー溶液75 mL中、25 mLの血清貯蔵溶液[1容量のウマ血清(Sigma)を9容量の500 mMの酢酸バッファー溶液で希釈し、pHを塩酸で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上に置き、240 µL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秒間振とうした。さらに15分後、サンプルの濁度を640 nmで測定し、それぞれのサンプルのヒアルロンダーゼ活性(U/mL)を標準曲線に合わせるにより決定した。

【0353】

比活性(ユニット/mg)を、ヒアルロンダーゼ活性(U/mL)をタンパク質濃度(mg/mL)で除することにより計算した。

【0354】

実施例13

Gen1ヒトsPH20の生産および精製

A. 5 Lバイオリアクタープロセス

3D35Mのバイアルを解凍し、振盪フラスコから100 nMのメトトレキサートおよびGlutaMAXTM-1(Invitrogen)を補ったCD-CHO培地(Invitrogen, Carlsbad Calif.)中で1 Lのスピナーフラスコによって拡大した。細胞を、1 mL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5 L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0-100 cc/分のエアオーバーレイで、温度設定値37 °C、pH7.2(開始設定値)であった。168時間で、250 mLのFeed #1培地(50 g/Lのグルコースを含むCD-CHO)を加えた。216時間で、250 mLのFeed #2培地(50 g/Lのグルコースおよび10 mMの酪酸ナトリウムを含むCD-CHO)を加え、264時間で、250 mLのF

10

20

30

40

50

eed # 2 培地を加えた。このプロセスによって、 6×10^6 個細胞 / ml の最大細胞密度で 1 ml あたり 1600 ユニットの最終生産性が得られた。酪酸ナトリウムの添加は、生産の最終段階で可溶性 rHuPH20 の生産を劇的に増強させた。

【0355】

3D35M クローンから得た馴化培地を、10 mM HEPES pH 7.0 への深層濾過およびタンジェンシャルフローダイアフィルトレーションにより清澄化した。次に、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 (Prometics) 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り精製した。

10

【0356】

可溶性 rHuPH20 を Qセファロースと結合させ、同じバッファー中で 400 mM の NaCl で溶離した。溶離物を 2 M の硫酸アンモニウムで 500 mM の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、次に同じ条件下でボ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 のピシン中 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 中に溶離した。溶離物を 5 mM のリン酸カリウムおよび 1 mM の CaCl_2 中 pH 6.9 でセラミックヒドロキシアパタイト樹脂上に負荷し、0.1 M の CaCl_2 を含む 80 mM のリン酸カリウム、pH 7.4 で溶離した。

【0357】

20

得られた精製された可溶性 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 12) によって、65,000 USP ユニット / mg タンパク質を超える比活性を有していた。精製された sPH20 は、0.1% の TFA / H_2O から 0.1% の TFA / 90% のアセトニトリル / 10% の H_2O の間の勾配で 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離し、PNGase-F での処理の際に鮮明な 51 kDa バンドに減少する SDS 電気泳動法により単一の広範な 61 kDa バンドとして分離された。N-末端アミノ酸シーケンシングによって、リーダーペプチドが効率的に除去されていることが示された。

【0358】

B. 100 L のバイオリクター細胞培養への上流細胞培養拡大プロセス
スケールアッププロセスを使用して、3D35M 細胞の 4 つの異なるバイアルから可溶性 rHuPH20 を別々に精製して、sHuPH20 の 4 つの別々のバッチ; HUA0406C、HUA0410C、HUA0415C および HUA0420C を生産する。それぞれのバイアルを、125 L バイオリクターによって別個に拡大および培養し、次にカラムクロマトグラフィーを使用して精製した。プロセスを通じてサンプルをとり、酵素収率のようなパラメーターを評価した。以下に提供されるプロセスの記載は、バイオリクター出発および供給培地容量、転送細胞密度ならびに洗浄および溶離容量のような事柄の典型的な記載を示す。正確な数は各バッチでわずかに変化し、表 24 から 30 に詳細に記載されている。

30

【0359】

4 つのバイアルの 3D35M 細胞を 37 °C 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 を含む 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 振とうフラスコに再懸濁し、37 °C、7% CO_2 インキュベーターに置いた。細胞を 125 mL 振とうフラスコ中で 40 mL まで拡大した。細胞密度が $1.5 - 2.5 \times 10^6$ 細胞 / ml に達したとき、培養物を 100 mL 培養容量で 125 mL スピナーフラスコに拡大した。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 $1.5 - 2.5 \times 10^6$ 細胞 / ml に達したとき、培養物を 200 mL 培養容量で 250 mL スピナーフラスコに拡大し、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 $1.5 - 2.5 \times 10^6$ 細胞 / ml に達したとき、培養物を 800 mL 培養容量で 1 L スピナーフラスコに拡大し、37 °C

40

50

、7% CO₂でインキュベートした。細胞密度が1.5 - 2.5 × 10⁶細胞/mlに達したとき、培養物を5 L培養容量で6 L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細胞/mlに達したとき、培養物を20 L培養容量で36 L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。

【0360】

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スピナーフラスコ中の細胞密度が1.8 - 2.5 × 10⁶細胞/mlに達したとき、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)へ移し、85 Lの最終容積および約4 × 10⁵細胞/mlの播種密度が得られた。パラメーターは、温度設定値、37℃；pH：7.2；溶存酸素：25% ± 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、タンパク質生産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物を加えた。6日目に、3.4 LのFeed # 1培地 (CD CHO + 50 g/Lのグルコース + 40 mL/LのGlutamax™ - 1)を加え、培養温度を36.5℃に変更した。9日目に、3.5 LのFeed # 2 (CD CHO + 50 g/Lのグルコース + 40 mL/LのGlutamax™ - 1 + 1.1 g/Lの酪酸ナトリウム)を加え、培養温度を36℃に変更した。11日目に、3.7 LのFeed # 3 (CD CHO + 50 g/Lのグルコース + 40 mL/LのGlutamax™ - 1 + 1.1 g/Lの酪酸ナトリウム)を加え、培養温度を35.5℃に変更した。14日目または細胞の生存能力が50%未満に低下したとき、リアクターを回収した。プロセスは、800万個の細胞/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の生産をもたらした。回収時に、培養物を、インビトロおよびインビボ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。

【0361】

100リットルのバイオリアクター細胞培養回収物を、ポリエーテルスルホン培地 (Sartorius) を有する一連の使い捨てカプセルフィルター：最初に、8.0 μmデブスカプセル、0.65 μmデブスカプセル、0.22 μmカプセルを通し、最後に、0.22 μm Sartopore 2000 cm² フィルターを通して、100 L滅菌保存バッグに入れた。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、次に10 mMのHEPES、25 mMのNa₂SO₄、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 μm最終フィルターを通し、20 L滅菌保存バッグに入れた。表19は、細胞培養物、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。

10

20

30

【表 26】

表19.細胞培養物、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				
パラメーター	HUA0406C	HUA04010 C	HUA0415C	HUA0420C
解凍から100Lバイ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($\times 10^6$ 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($\times 10^6$ 細胞/ml)	5.65	8.70	6.07	9.70
回収生存能力(%)	41	48	41	41
回収力価(U/ml)	1964	1670	991	1319
100Lバイリアクターの時間(日)	13	13	12	13
清澄化された回収容量(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
バッファー交換された濃縮物酵素アッセイ(U/mL)	15829	11649	9915	8679
濾過されバッファー交換された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量(mL)	10699	13578	12727	20500
酵素ユニットの比率 濃縮物/回収物	0.87	0.96	1.32	1.4

10

20

【0362】

Qセファロース(Pharmacia)イオン交換カラム(3L樹脂、高さ=20cm、直径=14cm)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カラム体積の10mMのTris、20mMの Na_2SO_4 、pH7.5で平衡にした。濃縮されダイフィルトレーションした(diafiltered)回収物を100cm/時の流速でQカラムに負荷した。カラムを5カラム体積の10mMのTris、20mMの Na_2SO_4 、pH7.5および10mMのHepes、50mMのNaCl、pH7.0で洗浄した。タンパク質を10mMのHepes、400mMのNaCl、pH7.0で溶離し、0.22 μm 最終フィルターを通して濾過し滅菌バッグに入れた。

30

【0363】

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行った。フェニル-セファロース(PS)カラム(9.1L樹脂、高さ=29cm、直径=20cm)を調製した。カラムを、5カラム体積の5mMのリン酸カリウム、0.5Mの硫酸アンモニウム、0.1mMの CaCl_2 、pH7.0で平衡にした。上記から得たタンパク質溶離物に、2Mの硫酸アンモニウム、1Mのリン酸カリウムおよび1Mの CaCl_2 貯蔵溶液をそれぞれ5mM、0.5Mおよび0.1mMの最終濃度に補った。タンパク質を100cm/時の流速でPSカラムに負荷した。5mMのリン酸カリウム、0.5Mの硫酸アンモニウムおよび0.1mMの CaCl_2 pH7.0を100cm/時で加えた。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。

40

【0364】

50

PS - 精製されたタンパク質を、5カラム体積の5 mMのリン酸カリウム、0.5 Mの硫酸アンモニウムで平衡にされているアミノフェニルポロン酸カラム (ProMedics) (6.3 L樹脂、高さ = 20 cm、直径 = 20 cm) に負荷した。タンパク質を100 cm / 時の流速でカラムに通し、カラムを5 mMのリン酸カリウム、0.5 Mの硫酸アンモニウム、pH 7.0で洗浄した。次にカラムを20 mMのピシン、100 mMのNaCl、pH 9.0で洗浄し、タンパク質を50 mMのHepes、100 mMのNaCl pH 6.9で溶離し、滅菌フィルターを通して20 L滅菌バッグに入れた。溶離物をバイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について試験した。

【0365】

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のリン酸カリウム、100 mMのNaCl、0.1 mMのCaCl₂ pH 7.0で平衡にした。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試験した (LALアッセイ)。アミノフェニルポロン酸で精製されたタンパク質にリン酸カリウムおよびCaCl₂を5 mMのリン酸カリウムおよび0.1 mMのCaCl₂の最終濃度を得るために補い、100 cm / 時の流速でHAPカラムに負荷した。カラムを、5 mMのリン酸カリウム pH 7.0、100 mMのNaCl、0.1 mMのCaCl₂、次に10 mMのリン酸カリウム pH 7.0、100 mMのNaCl、0.1 mMのCaCl₂ pHで洗浄した。タンパク質を70 mMのリン酸カリウム pH 7.0で溶離し、0.22 μmフィルターを通して5 L滅菌保存バッグに入れた。溶離物をバイオバーデン、タンパク質濃度および酵素活性について試験した。

【0366】

次に、HAP - 精製されたタンパク質を、圧力タンクによって20 nMの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、単糖類およびシアル酸プロファイリングおよびプロセス関連不純物について試験した。次に、濾液中のタンパク質を、10 kD分子量カットオフ (MWCO) Sartocoon Sliceタンジェンシャルフロー濾過 (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、最初にHepes / 塩水 (10 mMのHepes、130 mMのNaCl、pH 7.0) で洗浄することにより調製し、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試験した。濃縮されたタンパク質で、最終バッファー：10 mMのHepes、130 mMのNaCl、pH 7.0への6 x バッファー交換を実施した。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試験した。

【0367】

表20から26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 27】

表20. Qセフェアロースカラムデータ				
パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
負荷容量(mL)	10647	13524	12852	20418
負荷容量/樹脂容量比	3.1	4.9	4.5	7.3
カラム容量(mL)	2770	3840	2850	2880
溶離物容量(mL)	6108	5923	5759	6284
溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
溶離物酵素アッセイ(U/mL)	24493	26683	18321	21052
酵素収率(%)	65	107	87	76

10

【表 28】

表21. フェニルセフェアロースカラムデータ				
パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
貯蔵溶液添加前の容量(mL)	5670	5015	5694	6251
負荷容量(mL)	7599	6693	7631	8360
カラム容量(mL)	9106	9420	9340	9420
負荷容量/樹脂容量比	0.8	0.71	0.82	0.89
溶離物容量(mL)	16144	18010	16960	17328
溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
溶離物酵素アッセイ(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 29】

表22. アミノフェニルホロン酸カラムデータ				
パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
負荷容量(mL)	16136	17958	16931	17884
負荷容量/樹脂容量比	2.99	3.15	3.08	2.98
カラム容量(mL)	5400	5700	5500	5300
溶離物容量(mL)	17595	22084	20686	19145
溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
濾過された溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	試験していない	0.03	0.00	0.04
溶離物酵素アッセイ(U/mL)	4050	2410	1523	4721
タンパク質収率(%)	0	11	11	12
酵素収率(%)	測定していない	41	40	69

40

【 0 3 6 8 】

【表 3 0】

パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
貯蔵溶液添加前の容量(mL)	16345	20799	20640	19103
負荷容量/樹脂容量比	10.95	13.58	14.19	12.81
カラム容量(mL)	1500	1540	1462	1500
負荷容量(mL)	16429	20917	20746	19213
溶離物容量(mL)	4100	2415	1936	2419
溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	試験していない	0.24	0.17	0.23
濾過された溶離物のタンパク質濃度(mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
溶離物酵素アッセイ(U/mL)	14051	29089	20424	29826
タンパク質収率(%)	試験していない	93	53	73
酵素収率(%)	87	118	140	104

10

【表 3 1】

パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容量(mL)	4077	2233	1917	2419
濾液容量(mL)	4602	3334	2963	3504
濾液のタンパク質濃度(mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
濾過された溶離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(%)	試験していない	93	82	101

20

【表 3 2】

パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容量(mL)	4575	3298	2963	3492
濃縮物容量(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

30

40

【表 3 3】

表26.最終製剤データへのバッファー交換				
パラメーター	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
出発容量(mL)	562	407	237	316
最終容量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

10

【 0 3 6 9 】

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 の充填容量を有する滅菌バイアルに無菌的に充填した。タンパク質をオペレーター制御ポンプへ 0 . 2 2 μ m 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充填した。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物について目視検査し、次に標識化した。標識化後、バイアルを、液体窒素中にわずか 1 分沈めることにより急速冷凍し、 -15 (-20 ± 5) で保存した。

20

【 0 3 7 0 】

実施例 1 4

可溶性ヒト P H 2 0 (r H u P H 2 0) を含む G e n 2 細胞の生産

実施例 1 3 に記載されている G e n 1 3 D 3 5 M 細胞系を、より高いメトトレキサートレベルに適応させ、世代 2 (G e n 2) クローンを生産した。3 D 3 5 M 細胞を、確立されたメトトレキサート含有培養物から、4 m M の G l u t a M A X - 1 ^{T M} および 1 . 0 μ M のメトトレキサートを含む C D C H O 培地へ播種した。細胞を、3 7 % C O ₂ 加湿インキュベーター中で 4 6 日間にわたって増殖させ、9 回継代することにより、より高い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 のメトトレキサートを有する培地を含む 9 6 ウェル組織培養プレートにおける制限希釈によりクローニングした。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 m M の G l u t a M A X - 1 ^{T M} および 2 . 0 μ M のメトトレキサートを含む C D C H O 培地で 2 0 継代の間、増殖させた。3 E 1 0 B 細胞系のマスター細胞バンク (M C B) を作製し、凍結し、後の試験に使用した。

30

【 0 3 7 1 】

細胞系の増幅を、4 m M の G l u t a M A X - 1 ^{T M} および 4 . 0 μ M のメトトレキサートを含む C D C H O 培地中で 3 E 1 0 B 細胞を培養することにより続けた。1 2 継代後、細胞を研究細胞バンク (R C B) としてバイアル中で凍結した。R C B の 1 つのバイアルを解凍し、8 . 0 μ M のメトトレキサートを含む培地で培養した。5 日後、培地中のメトトレキサート濃度を、1 6 . 0 μ M、次に 1 8 日後に 2 0 . 0 μ M に増加させた。2 0 . 0 μ M のメトトレキサートを含む培地中の 8 継代の細胞を、4 m M の G l u t a M A X - 1 ^{T M} および 2 0 . 0 μ M のメトトレキサートを含む C D C H O 培地を含む 9 6 ウェル組織培養プレートで制限希釈によりクローニングした。5 - 6 週間後にクローンを同定し、クローン 2 B 2 を、2 0 . 0 μ M のメトトレキサートを含む培地における拡大のために選択した。1 1 継代後、2 B 2 細胞を研究細胞バンク (R C B) としてバイアル中で凍結した。

40

【 0 3 7 2 】

得られた 2 B 2 細胞は、可溶性組換えヒト P H 2 0 (r H u P H 2 0) を発現するジヒドロ葉酸レダクターゼ欠失 (d h f r -) D G 4 4 C H O 細胞である。可溶性 P H 2 0 は、2 B 2 細胞中に約 2 0 6 コピー / 細胞のコピー数で存在する。r H u P H 2 0 特異的

50

プローブを使用するSpe I -、Xba I - およびBamHI / HindIII消化ゲノム2B2細胞DNAのサザンブロット分析は、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を有する、~7.7 kbの1つの主要なハイブリダイズバンドおよび4つの少量のハイブリダイズバンド(~13.9、~6.6、~5.7および~4.6 kb)；Xba Iで消化されたDNAを有する、~5.0 kbの1つの主要なハイブリダイズバンドおよび2つの少量のハイブリダイズバンド(~13.9および~6.5 kb)；ならびにBamHI / HindIIIで消化された2B2 DNAを使用して観察された~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：139)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つの塩基対の違いを除いて、参照配列(配列番号：110)と同一であることを示した。これは、アミノ酸配列に対して効果がないサイレント変異である。

10

【0373】

実施例15

A. 300 L バイオリアクター細胞培養におけるGen2可溶性rHuPH20の生産
HZ24-2B2のバイアルを解凍し、振とうフラスコから20 μMのメトトレキサートおよびGlutaMAX-1TM(Invitrogen)を補ったCD-CHO培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)中で36 Lのスピナーフラスコによって拡大した。簡潔には、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、20 mLの新鮮培地を有する125 mL振とうフラスコに再懸濁し、37 °C、7% CO₂インキュベーターに置いた。細胞を125 mL振とうフラスコ中で40 mLにまで拡大した。細胞密度が1.5 × 10⁶細胞/mL以上に達したとき、培養物を100 mL培養容量で125 mLスピナーフラスコに拡大した。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 × 10⁶細胞/mL以上に達したとき、培養物を200 mL培養容量で250 mLスピナーフラスコに拡大し、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 × 10⁶細胞/mL以上に達したとき、培養物を800 mL培養容量で1 Lスピナーフラスコに拡大し、37 °C、7% CO₂でインキュベートした。細胞密度が1.5 × 10⁶細胞/mL以上に達したとき、培養物を5000 mL培養容量で6 Lスピナーフラスコに拡大し、37 °C、7% CO₂でインキュベートした。細胞密度が1.5 × 10⁶細胞/mL以上に達したとき、培養物を32 L培養容量で36 Lスピナーフラスコに拡大し、37 °C、7% CO₂でインキュベートした。

20

30

【0374】

400 Lリアクターを滅菌し、230 mL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。約30 Lの細胞を36 Lスピナーフラスコから400 Lバイオリアクター(Braun)へ4.0 × 10⁵生存細胞/mLの播種密度で260 Lの全容量で移した。パラメーターは、温度設定値、37 °C；羽根車速度40-55 RPM；容器圧：3 psi；エアースパージ0.5-1.5 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、タンパク質生産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物を加えた。120時間目に(5日目)、10.4 LのFeed #1培地(4 × CD-CHO + 33 g/Lのグルコース + 160 mL/LのGlutaMAX-1TM + 83 mL/LのYeastolate + 33 mg/LのrHuインスリン)を加えた。168時間目に(7日目)、10.8 LのFeed #2(2 × CD-CHO + 33 g/Lのグルコース + 80 mL/LのGlutaMAX-1TM + 167 mL/LのYeastolate + 0.92 g/Lの酪酸ナトリウム)を加え、培養温度を36.5 °Cに変更した。216時間目に(9日目)、10.8 LのFeed #3(1 × CD-CHO + 50 g/Lのグルコース + 50 mL/LのGlutaMAX-1TM + 250 mL/LのYeastolate + 1.80 g/Lの酪酸ナトリウム)を加え、培養温度を36 °Cに変更した。264時間目に(11日目)、10.8 LのFeed #4(1 × CD-CHO + 33 g/Lのグルコース + 33 mL/LのGlutaMAX-1TM + 250 mL/LのYeastolate + 0.92 g/Lの酪酸ナ

40

50

トリウム)を加え、培養温度を35.5に変更した。供給培地の添加は、生産の最終段階で可溶性rHuPH20の生産を劇的に増強すると観察された。14または15日目または細胞の生存能力が40%未満に低下したとき、リアクターを回収した。プロセスは、1200万個の細胞/mlの最大細胞密度で17,000ユニット/mlの最終生産性をもたらした。回収時に、培養物を、インビトロおよびインビボ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、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。

【0375】

培養物を、それぞれ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、4つの並行なMillistak濾過システムモジュール(Millipore)、次にセルロース膜を通して、次に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、第2の単一のMillistak濾過システム(Millipore)、次にセルロース膜を通して、次に0.22μm最終フィルターを通して蠕動ポンプにより、350Lの容積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10mMのEDTAおよび10mMのTrisを補って、7.5のpHにした。培養物を、4つのSartoslice TFF 30kDa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)を使用するタンジェンシャルフロー濾過(TFF)装置、次に10mMのTris、20mMのNa₂SO₄、pH7.5を用いる10×バッファー交換で10×濃縮し、0.22μm最終フィルターに入れ、50L滅菌保存バッグに入れた。

【0376】

濃縮されダイフィルトレーションした回収物をウイルスに対して不活性化させた。ウイルス不活性化の前に、10%のTriton(登録商標)X-100、3%のトリ(n-ブチル)ホスフェート(TNBP)の溶液を調製した。濃縮されダイフィルトレーションした回収物を、36Lのガラス反応容器中で1%のTriton(登録商標)X-100、0.3%のTNBPに1時間暴露し、直後にQカラムで精製した。

【0377】

B.Gen2可溶性rHuPH20の精製

Qセファロース(Pharmacia)イオン交換カラム(9L樹脂、H=29cm、D=20cm)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カラム体積の10mM Tris、20mM Na₂SO₄、pH7.5で平衡にした。ウイルス不活性化後、濃縮したダイフィルトレーションした回収物を、100cm/時の流速でQカラムに負荷した。カラムを、5カラム体積の10mM Tris、20mM Na₂SO₄、pH7.5および10mM Hepes、50mM NaCl、pH7.0で洗浄した。10mM Hepes、400mM NaCl、pH7.0を用いてタンパク質を溶離し、0.22μm最終フィルターを通して滅菌バッグに濾過した。溶離サンプルを、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試験した。A₂₈₀吸光度測定値を、交換の開始および終了時にとった。

【0378】

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行った。フェニル-セファロース(PS)カラム(19-21L樹脂、H=29cm、D=30cm)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カラム体積の5mM リン酸カリウム、0.5M 硫酸アンモニウム、0.1mM CaCl₂、pH7.0で平衡にした。Qセファロースカラムから溶離されたタンパク質を、それぞれ5mM、0.5Mおよび0.1mMの最終濃度を得るために、2M 硫酸アンモニウム、1M リン酸カリウムおよび1M CaCl₂貯蔵溶液を補った。タンパク質を、100cm/時の流速でPSカラムに負荷し、カラムフローを回収した。カラムを、5mM リン酸カリウム、0.5M 硫酸アンモニウムおよび0.1mM CaCl₂ pH7.0で100cm/時で洗浄

し、洗浄液を回収されたフロースルーに加えた。カラム洗浄液と混合し、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。

【0379】

アミノフェニルボロン酸カラム (Prometics) 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カラム体積の5 mM リン酸カリウム、0.5 M 硫酸アンモニウムで平衡にした。精製されたタンパク質を含むPSフロースルーを、100 cm/時の流速でアミノフェニルボロン酸カラムに負荷した。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 で洗浄した。カラムを、20 mM ビシン、0.5 M 硫酸アンモニウム、pH 9.0 で洗浄した。カラムを、20 mM ビシン、100 mM 塩化ナトリウム、pH 9.0 で洗浄した。50 mM HEPES、100 mM NaCl、pH 6.9 を用いてタンパク質を溶離し、滅菌フィルターを通して滅菌バッグに入れた。溶離サンプルを、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試験した。

10

【0380】

ヒドロキシアパタイト (HAP) カラム (Biorad) 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) について試験した。カラムを、5 mM リン酸カリウム、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂、pH 7.0 で平衡にした。アミノフェニルボロン酸で精製されたタンパク質を、5 mM リン酸カリウムおよび0.1 mM CaCl₂ の最終濃度に補い、100 cm/時の流速でHAPカラムに負荷した。カラムを、5 mM リン酸カリウム、pH 7.0、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂ で洗浄した。次に、カラムを、10 mM リン酸カリウム、pH 7.0、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂ で洗浄した。タンパク質を、70 mM リン酸カリウム、pH 7.0 で溶離し、0.22 μm滅菌フィルターを通して滅菌バッグに入れた。溶離サンプルを、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試験した。

20

【0381】

次に、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。最初に、滅菌されたViosartフィルター (Sartorius) を、2 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り調製した。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 中のフィルター処理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、単糖類およびシアル酸プロファイリングについて試験した。サンプルを、また、プロセス関連不純物について試験した。

30

【0382】

次に、濾液中のタンパク質を、10 kD分子量カットオフ (MWCO) Sartocoon Slicetangential Flow Filtration (TFF) システム (Sartorius) を使用して10 mg/mLに濃縮した。最初に、フィルターを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り調製し、透過物をpHおよび伝導率についてサンプリングした。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試験した。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試験した。

40

【0383】

次に、滅菌フィルター処理されたバルクタンパク質を、30 mLの滅菌テフロンバイアル (Nalgene) に20 mLで無菌的に分配した。次に、バイアルを急速冷凍し、-20 ±

50

5 で保存した。

【0384】

C. Gen 1可溶性 rHuPH20およびGen 2可溶性 rHuPH20の生産および精製の比較

300Lバイオリアクター細胞培養におけるGen 2可溶性 rHuPH20の生産および精製は、100Lバイオリアクター細胞培養におけるGen 1可溶性 rHuPH20の生産および精製と比較して（実施例13Bに記載されている）、プロトコールにおいていくつかの変化を含んだ。表27は、方法間の簡単なスケールアップ変化に加えて、典型的な違いを示す。

【表34】

プロセスの違い	Gen 1可溶性 rHuPH20	Gen 2可溶性 rHuPH20
細胞系	3D35M	2B2
細胞接種材料を拡大するために使用される培地	0.10 μMのメトトレキサート (0.045 mg/L) を含む	20 μMのメトトレキサート (9 mg/L) を含む
6 L培養以降における培地	0.10 μMのメトトレキサートを含む	メトトレキサートを含まない
36 Lスピナーフラスコ	機器使用なし 20 L 操作容量	pH、溶存酸素、スパージおよびオーバーレイガス流速をモニタリングおよび制御する機器使用が備えられている 32 L 操作容量
バイオリアクターにおける最終操作容量	125 Lバイオリアクター中約100 L (初期培養容量+65 L)	400 Lバイオリアクター中約300 L (初期培養容量+260 L)
最終バイオリアクターにおける培養培地	rHuインスリンなし	5.0 mg/LのrHuインスリン
培地供給容量	バイオリアクター細胞培養容量の4%、すなわち3.4、3.5および3.7 Lで増やし、~92 Lの標的バイオリアクター容量を得た	バイオリアクター細胞培養容量の4%、すなわち10.4、10.8、11.2および11.7 Lで増やし、~303 Lの標的バイオリアクター容量を得た

10

20

30

【表 3 5】

<p>培地供給</p>	<p>Feed # 1 培地 : CD CHO + 50 g / L のグルコース + 8 mM の GlutamaxTM-1</p> <p>Feed # 2 (CD CHO + 50 g / L のグルコース + 8 mM の Glutamax + 1.1 g / L の酪酸ナトリウム</p> <p>Feed # 3 : CD CHO + 50 g / L のグルコース + 8 mM の Glutamax + 1.1 g / L の酪酸ナトリウム</p>	<p>Feed # 1 培地 : 4 × CD CHO + 33 g / L のグルコース + 32 mM の Glutamax + 16.6 g / L の Yeastolate + 33 mg / L の rHu インスリン</p> <p>Feed # 2 : 2 × CD CHO + 33 g / L のグルコース + 16 mM の Glutamax + 33.4 g / L の Yeastolate + 0.92 g / L の酪酸ナトリウム</p> <p>Feed # 3 : 1 × CD CHO + 50 g / L のグルコース + 10 mM の Glutamax + 50 g / L の Yeastolate + 1.80 g / L の酪酸ナトリウム</p> <p>Feed # 4 : 1 × CD CHO + 33 g / L のグルコース + 6.6 mM の Glutamax + 50 g / L の Yeastolate + 0.92 g / L の酪酸ナトリウム</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
-------------	---	---	-------------------------------

【表 3 6】

<p>バイオリアクター細胞培養物の濾過</p>	<p>順番に4つのポリエーテルスルホンフィルター(8.0 μm、0.65 μm、0.22 μmおよび0.22 μm)</p> <p>100L保存バッグ</p>	<p>第1段階—それぞれ4—8 μmに等級付けられた珪藻土の層および1.4—1.1 μm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、次にセルロース膜</p> <p>第2段階—0.4—0.11 μmに等級付けられた珪藻土の層および<0.1 μmに等級付けられた珪藻土の層を含む単一のモジュール、次にセルロース膜</p> <p>第3段階—0.22 μmポリエーテルスルホンフィルター</p> <p>300L保存バッグ</p> <p>回収された細胞培養物に10 mMのEDTA、10 mMのTrisを補って、7.5のpHにする。</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>クロマトグラフィー前の濃縮およびバッファー交換</p>	<p>Millipore Spiralポリエーテルスルホン30K MWC Oフィルターで2 TFFで濃縮</p> <p>10 mMのHepes、25 mMのNaCl、pH7.0で濃縮物を6×バッファー交換する</p> <p>20L滅菌保存バッグ</p>	<p>4つのSartorius Sartoslic e TFF 30K M WCOフィルターを使用して濃縮する</p> <p>10 mMのTris、20 mMのNa2SO4、pH7.5で濃縮物を10×バッファー交換する</p> <p>50L滅菌保存バッグ</p>	<p>30</p>

【表37】

クロマトグラフィー前のウイルス不活性化	なし	1%のTriton（登録商標）X-100、0.3%のトリブチル Phosphate、pH7.5の添加で行ったウイルス不活性化
第1精製工程（Qセファローズ）	吸光度測定値なし	開始および終了時の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 Virosept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ー交換	Hepes/塩水 pH 7.0バッファー 1mg/mlに濃縮されたタンパク質	ヒスチジン/塩水、pH6.0バッファー 10mg/mlに濃縮されたタンパク質

10

【0385】

実施例16

シアル酸および単糖類含有量の測定

20

可溶性rHuPH20のシアル酸および単糖類含有量は、トリフルオロ酢酸での加水分解後の逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）により評価することができる。1つの例において、精製されたヒアルロニダーゼロット番号HUB0701E（1.2mg/ml；本質的に実施例15に記載されているとおりに生産され精製された）のシアル酸および単糖類含有量を測定した。簡潔には、100μgのサンプルを100で4時間デュブリケートで40%（v/v）のトリフルオロ酢酸で加水分解した。加水分解後、サンプルを乾燥させ、300μLの水に再懸濁した。それぞれの再懸濁されたサンプルからの45μLのアリコート新しいチューブに移し、乾燥させ、10μLの10mg/mlの酢酸ナトリウム溶液をそれぞれに加えた。放出された単糖類を、50μLの30mg/mlの2-アミノ安息香酸、20mg/mlの水素化シアノホウ素ナトリウム、約40mg/mlの酢酸ナトリウムおよび20mg/mlのホウ酸を含むメタノール溶液の添加により蛍光標識した。混合物を、80で暗所で30分間インキュベートした。誘導体化反応を、440μLの移動相A（0.2%（v/v）のn-ブチルアミン、0.5%（v/v）のリン酸、1%（v/v）のテトラヒドロフラン）の添加によりクエンチした。水のマトリックスブランクも、陰性対照としてヒアルロニダーゼサンプルについて記載されているとおりに加水分解し、誘導体化した。放出された単糖類を、Octadecyl（C₁₈）逆相カラム（4.6×250mm、5μm粒径；J.T. Baker）を使用するRPLCにより分離し、蛍光検出（360nm励起、425nm発光）によりモニタリングした。単糖類含有量の定量を、ヒアルロニダーゼサンプル由来のクロマトグラムを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む単糖類標準のクロマトグラムと比較することにより行った。表28は、ヒアルロニダーゼ分子あたりのそれぞれの単糖類のモル比を示す。

30

40

【表38】

ロット	再現	GlcN	GalN	ガラクトース	マンノース	フコース
HUB0701E	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

50

* G a l N 結果は、検出限界より低かった

【 0 3 8 6 】

実施例 1 7

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 - 末端シーケンシングを、100 L バイオリアクター容積 (ロット H U A 0 5 0 5 M A) 中の 3 D 3 5 M 細胞および 3 0 0 L バイオリアクター容積 (ロット H U B 0 7 0 1 E B) 中の 2 B 2 細胞から生産され精製された s H u P H 2 0 の 2 つのロットで行った。ロットを、N - 末端に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開裂させるエンドプロテアーゼ A s p - N で別々に消化した。これは、配列番号 : 1 2 2 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 - 末端部分を放出する。C - 末端フ
ラグメントを分離し、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 におけるそれぞれの集団の配列および存在量を決定した。

10

【 0 3 8 7 】

3 D 3 5 M 細胞および 2 B 2 細胞からの可溶性 r H u P H 2 0 調製物が不均一性を示し、それらの C - 末端配列 (表 3 0 および 3 1) が互いに異なっているポリペプチドを含むことが観察された。この不均一性は、生産および精製プロセス中の細胞培養培地または他の溶液に存在するペプチダーゼにより発現された 4 4 7 個のアミノ酸ポリペプチド (配列番号 : 1 2 2) の C - 末端開裂の結果であろう。可溶性 r H u P H 2 0 調製物におけるポリペプチドは、配列番号 : 1 2 2 に示されている可溶性 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のそれぞれの完全アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 : 1 2 2 から 1 2 6 に示されている。表 2 9 および 3 0 に記載されているように、3 D 3
5 M 細胞および 2 B 2 細胞からの可溶性 r H u P H 2 0 調製物中のそれぞれのポリペプチ
ドの存在量は異なる。

20

【表 3 9】

表 2 9 . ロット H U A 0 5 0 5 M A からの C - 末端フラグメントの分析							
フラグメント	アミノ酸位置(配列番号:122と比較して)	配列	理論上の質量	実験的質量	誤差	溶離時間	存在量
D28a	431-447	DAFKLPPME TEEPQIFY (配列番号:191)	2053.97	2054.42	0.45	99.87	0.2%
D28b	431-446	DAFKLPPME TEEPQIF (配列番号:192)	1890.91	1891.28	0.37	97.02	18.4%
D28c	431-445	DAFKLPPME TEEPQI (配列番号:193)	1743.84	1744.17	0.33	86.4	11.8%
D28d	431-444	DAFKLPPME TEEPQ (配列番号:194)	1630.70	1631.07	0.32	74.15	56.1%
D28e	431-443	DAFKLPPME TEEP (配列番号:195)	1502.70	1502.98	0.28	77.36	13.6%
D28f	431-442	DAFKLPPME TEE (配列番号:196)	1405.64	ND	N/A	N/A	0.0%

10

20

30

【表40】

表30.ロットHUB0701EBからのC-末端フラグメントの分析							
フラグメント	アミノ酸位置(配列番号:122と比較して)	配列	理論上の質量	実験的質量	誤差	溶離時間	存在量
D28a	431-447	DAFKLPPME TEEPQIFY(配列番号:191)	2053.97	2054.42	0.45	99.89	1.9%
D28b	431-446	DAFKLPPME TEEPQIF(配 列番号:192)	1890.91	1891.36	0.45	96.92	46.7%
D28c	431-445	DAFKLPPME TEEPQI(配 列番号:193)	1743.84	1744.24	0.40	85.98	16.7%
D28d	431-444	DAFKLPPME TEEPQ(配列 番号:194)	1630.70	1631.14	0.39	73.9	27.8%
D28e	431-443	DAFKLPPME TEEP(配列 番号:195)	1502.70	1503.03	0.33	77.02	6.9%
D28f	431-442	DAFKLPPME TEE(配列番 号:196)	1405.64	ND	N/A	N/A	0.0%

10

20

【0388】

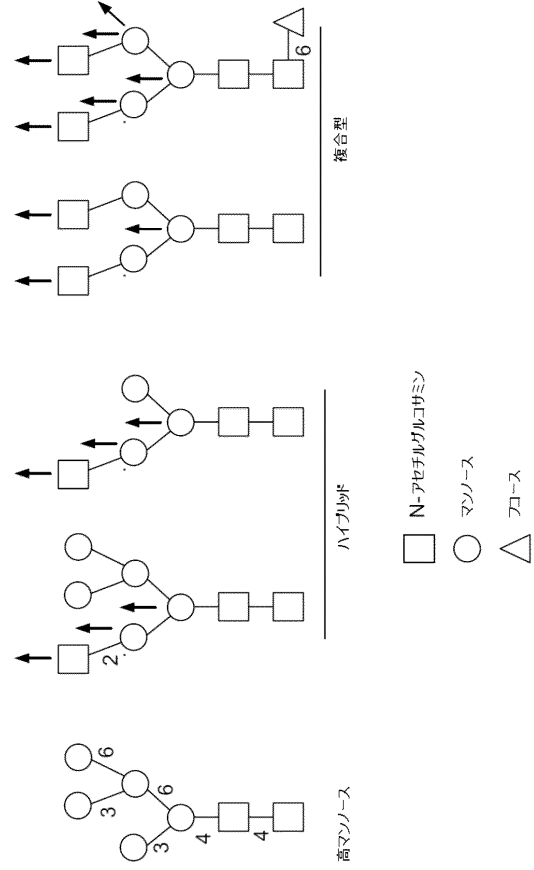
修飾は当業者に明らかであるため、本発明は特許請求の範囲のみにより制限されると意図される。

30

【 図 1 】

EGPH20 チンバノスター-PH20	MSVILKFKHIFERSFKSSGVSQIVFTFLIPCCLLNFRAPPVTPNVPFLWANMAPSEFC60 MSVILKFKHIFERSFKSSGVSQIVFTFLIPCCLLNFRAPPVTPNVPFLWANMAPSEFC60 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	LKGFDEPLDMSLFSFSGSPRIWATGGQVTFYVDRLYGYPYIDSTTGGVTYNGGIPOKISL120 LKGFDEPLDMSLFSFSGSPRIWATGGQVTFYVDRLYGYPYIDSTTGGVTYNGGIPOKISL120 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	QDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGNAVIDMEEMRPTWARMKPKDVKYKRSIELVOOQNWQLS180 QDHLDKAKKDIITFYMPVDNLGNAVIDMEEMRPTWARMKPKDVKYKRSIELVOOQNWQLS180 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	LTEATEKAKOFEKAGKDFLVTIKLGLLRPNHLWGYLFPDCCYNHYYKKGNGSCFN240 LTEATEKAKOFEKAGKDFLVTIKLGLLRPNHLWGYLFPDCCYNHYYKKGNGSCFN240 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	VEIKRNDLSQLMNRESTALYPSIYLNTOQSPVAATLYVRRNRVREARVSKIPDAKSPLPV300 VEIKRNDLSQLMNRESTALYPSIYLNTOQSPVAATLYVRRNRVREARVSKIPDAKSPLPV300 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	FAYTRIVFTDQWLKFLSODELWYTFGETVALGASGIVTNGTLLSMRSMKSCLLLDNYMET360 FAYTRIVFTDQWLKFLSODELWYTFGETVALGASGIVTNGTLLSMRSMKSCLLLDNYMET360 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	TLNIPYIINVTLAAKMSOVLCOEGGVCIRKNNSSDYHLNPNDFAIOLKKGKFTVRGK420 TLNIPYIINVTLAAKMSOVLCOEGGVCIRKNNSSDYHLNPNDFAIOLKKGKFTVRGK420 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	PTLEDLEOFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKDIDAVDVCIDAGGVCIDAEFKPPMETEEEPQI480 PTLEDLEOFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKDIDAVDVCIDAGGVCIDAEFKPPMETEEEPQI480 *****
EGPH20 チンバノスター-PH20	FYNASPSTLSATMELVNSLLELFLSSVASL509 FYNASPSTLSATMELVNSLLELFLSSVASL510 *****

【 図 2 】



【 図 3 A 】

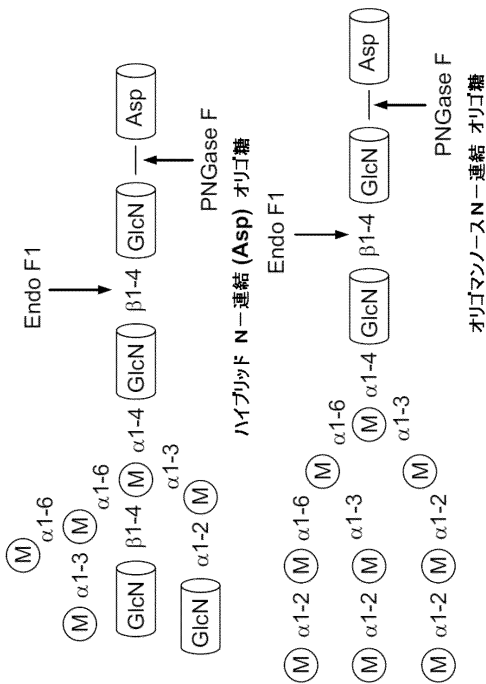


FIG. 3A

【 図 3 B 】

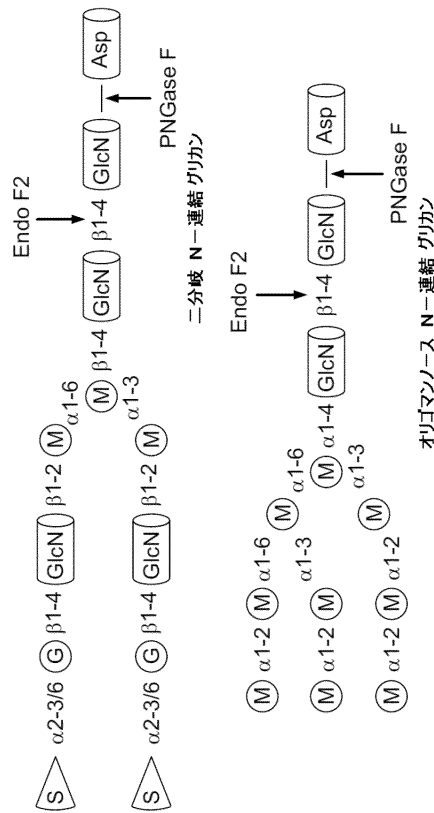


FIG. 3B

【 図 3 C 】

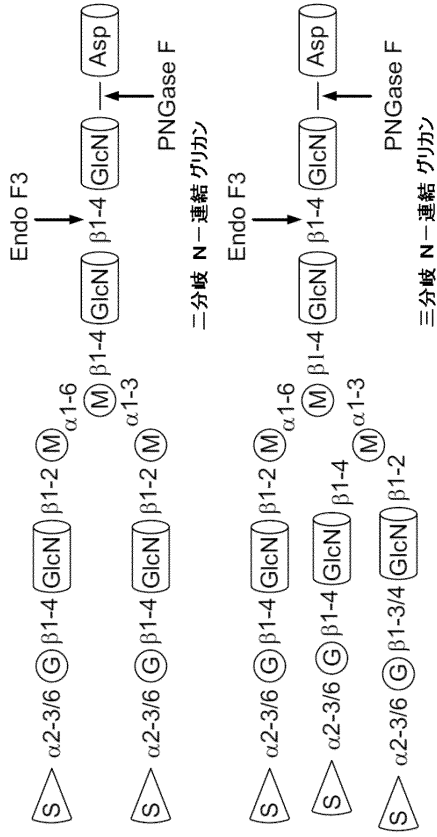


FIG. 3C

【 図 3 D 】

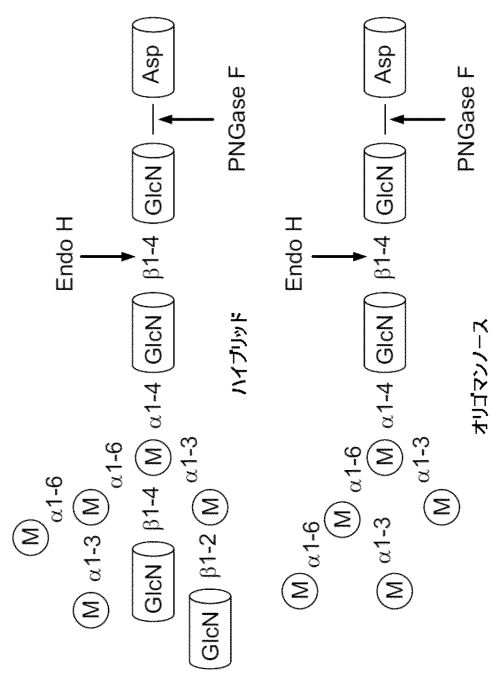


FIG. 3D

【 配列表 】

0005670913000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100140497

弁理士 野中 信宏

(72)発明者 ゲ・ウェイ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 1 カリフォルニア州サンディエゴ、ミロ・サークル 1 1 5 3 0 番

(72)発明者 クリシュナサミ・パナーセルバム

アメリカ合衆国 9 2 0 6 4 カリフォルニア州ポーウェイ、モーニングサイド・ドライブ 1 4 9 1 7 番

(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 ルイス・ブックバインダー

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、ゲイブル・リッジ・ロード 1 4 8 2 3 番

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 3 1 0 1 7 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 8 / 1 0 1 0 9 8 (W O , A 2)

特表 2 0 0 6 - 5 2 4 5 0 7 (J P , A)

FEBS LETTERS , NL , ELSEVIER , 1 9 9 7 年 8 月 1 8 日 , Vol . 413 , No . 2 , pp.385-388

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b M e d

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)