

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036569**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.24

(51) Int. Cl. *C12N 9/26* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201500485

(22) Дата подачи заявки
2009.12.09

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА ГИАЛУРОНИДАЗЫ PH20

(31) **61/201,384; 61/281,240**

(32) **2008.12.09; 2009.11.13**

(33) **US**

(43) **2015.11.30**

(62) **201100908; 2009.12.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГАЛОЗИМ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Вен Ги, Паннирселвам Кришнасами,
Фрост Грегори Ай, Букбиндер Луис
(US)**

(74) Представитель:
Стояченко И.Л. (RU)

(56) US-A1-20040268425
DATABASE GenBank: EAL24330.1,
10.08.2004

(57) Изобретение предусматривает способ получения растворимых полипептидов PH20, активных в нейтральной среде. Полипептиды PH20, полученные способами, предусмотренными в данном изобретении, являются растворимыми белками, укороченными с С-конца, включая белки, в которых отсутствует вся сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря, и белки, содержащие один или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря соответствующего полноразмерного полипептида PH20 дикого типа. Также в данном изобретении предусмотрены способы получения других модифицированных укороченных с С-конца полипептидов PH20.

B1**036569****036569****B1**

Родственные заявки

Приоритет по данной заявке принадлежит предварительной заявке США № 61/281,240, авторами которой являются Ge Wei, Krishnasamy Panneerselvam, Louis Bookbinder и Gregory I. Frost, озаглавленной "EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF" (Длинные растворимые полипептиды PH20 и их использование), поданной 13 ноября 2009, и предварительной заявке США № 61/201,384, Ge Wei, Krishnasamy Panneerselvam, Louis Bookbinder и Gregory I. Frost, озаглавленной "EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF" (Длинные растворимые полипептиды PH20 и их использование), поданной 9 декабря 2008 года. Содержание вышеупомянутых родственных заявок в полном объеме включено в настоящее описание в виде ссылок.

Настоящая заявка родственна заявке США №12/653,245, поданной одновременно с настоящей заявкой, озаглавленной "EXTENDED SOLUBLE PH20 POLYPEPTIDES AND USES THEREOF" (Длинные растворимые полипептиды PH20 и их применение), которая претендует на приоритет предварительных заявок США №№ 61/281,240 и 61/201,384.

Содержание вышеупомянутых родственных заявок включено в настоящее описание в полном объеме в качестве ссылки.

Область техники

Изобретение относится к способу получения растворимых и активных в нейтральной среде полипептидов гиалуронидазы PH20, в том числе длинных растворимых полипептидов PH20. Изобретение также относится к способам получения N-гликозилированных и модифицированных полипептидов PH20.

Уровень техники

Гиалуронан (гиалуроновая кислота, ГК) представляет собой полипептид, распространенный во внеклеточном матриксе множества тканей, особенно в мягкой соединительной ткани. В организме млекопитающих ГК также преимущественно встречается в коже, хрящах и в синовиальной жидкости. Гиалуроновая кислота также является основным компонентом стекловидного тела глаза. ГК играет важную роль в различных физиологических процессах, таких как водный гомеостаз и гомеостаз белков плазмы (Laurent T. C. и др. (1992) FASEB J. 6: 2397-2404). Некоторые заболевания связаны с экспрессией и/или продукцией гиалуроновой кислоты. Гиалуронидазы представляют собой ферменты, которые разрушают гиалуронан. Выступая в роли катализаторов гидролиза ГК, гиалуронидазы могут быть использованы для лечения заболеваний или расстройств, связанных с накоплением ГК или других гликозаминогликанов. Кроме того, поскольку ГК является основным компонентом интерстициального барьера, гиалуронидазы способны увеличивать проницаемость тканей и, следовательно, могут быть использованы для усиления распространения и ускорения доставки терапевтических агентов. В терапевтических целях в комбинации с другими терапевтическими агентами, как правило, в качестве диспергирующих агентов и агентов, усиливающих распространение, были использованы различные гиалуронидазы (например Hydase™, Vitrase™ и Wydase™). Многие из указанных ферментов являются бычьими или овечьими белками, которые могут быть иммуногенными для человека. Таким образом, существует потребность в улучшенных композициях гиалуронидаз, которые могут быть использованы для лечения.

Краткое описание изобретения

Изобретение включает способы получения растворимых полипептидов PH20, активных в нейтральной среде, в том числе длинных растворимых полипептидов PH20 (esPH20). Полипептиды PH20, полученные способами, предусмотренными в данном изобретении, являются растворимыми белками, укороченными с С-конца, включая белки, в которых отсутствует вся сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря, и белки, содержащие один или больше аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря соответствующего полноразмерного полипептида PH20 дикого типа. Также в данном изобретении предусмотрены способы получения других модифицированных укороченных с С-конца полипептидов PH20.

Одним из предусмотренных в данном изобретении способов является способ получения полипептида гиалуронидазы PH20, включающий культивирование клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу PH20, в условиях, обеспечивающих продуцирование гиалуронидазы PH20 в клетках, где указанная гиалуронидаза PH20 является растворимой и активной в нейтральной среде и выбрана из:

а) полипептида, состоящего из последовательности аминокислот 36-469, 36-470, 36-471, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 или 36-500 из SEQ ID NO: 107; и

б) полипептида, идентичного по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более полипептиду по п. (а) и включающего только аминокислотные замены в последовательностях, указанных в п. (а).

Изобретение также предусматривает способ получения полипептида гиалуронидазы PH20, включающий культивирование клеток, содержащих вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу PH20, в условиях, обеспечивающих продуцирование гиалуронидазы PH20 в клетках, где указанная гиалуронидаза PH20 является растворимой и активной в нейтральной среде и выбрана из:

а) полипептида, состоящего из последовательности аминокислот 36-469, 36-470, 36-471, 36-495, 36-

496, 36-497, 36-498, 36-499 или 36-500 из SEQ ID NO: 107; и

б) полипептида, идентичного, по меньшей мере, на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более полипептиду по п. (а) и включающего только аминокислотные замены в последовательностях, указанных в п. (а).

Согласно некоторым вариантам выполнения изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая гиалуронидазу PH20, содержит стоп-кодон, функционально встроенный непосредственно после кодона С-концевой аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам выполнения изобретения гиалуронидаза PH20 N-гликозилирована.

Согласно другим вариантам выполнения изобретения способ предназначен для получения гиалуронидазы PH20, содержащей фрагмент N-ацетилглюкозамина, связанный, по меньшей мере, с тремя остатками аспарагина (N), в частности с остатками аспарагина 235, 368 и 393 из SEQ ID NO: 107.

Согласно некоторым вариантам выполнения изобретения способ предназначен для получения гиалуронидазы PH20, модифицированной путем сиаилирования, альбуминирования, фарнезилирования, карбоксилирования, гидроксилирования и/или фосфорилирования или модифицированной путем присоединения полимера, в частности, декстрана или ПЭГ.

Предусмотренные в данном изобретении полипептиды гиалуронидазы PH20 могут быть использованы вместо гиалуронидазы PH20, отдельно или в комбинации, в любых методах лечения или в комбинированной терапии, для которых гиалуронидазу PH20 используют в опубликованных заявках США №№ US20040268425, US20050260186 и US20060104968 и заявках США №№ 12/381,844, 12/386,249, 12/387,225 и 12/386,222.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены выравненные аминокислотные последовательности полипептидов PH20 человека (SEQ ID NO: 107) и шимпанзе (SEQ ID NO: 197) (выравнены с помощью программы выравнивания ClustalW2). Аминокислотные остатки сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря человеческого PH20, а также соответствующие аминокислоты в последовательности PH20 шимпанзе выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Символ "*" указывает, что расположенные выше остатки одинаковы для обеих выровненных последовательностей. Символ ":" указывает консервативные замены и символ "." указывает полуконсервативные замены.

На фиг. 2 приведены основные типы N-гликанов у позвоночных, в том числе богатые маннозой гликаны, гибридные гликаны и сложные гликаны.

На фиг. 3 показаны сайты расщепления эндогликозидаз.

На фиг. 3A показаны сайты расщепления для эндогликозидазы F1 и пептид N-гликозидазы F (ПНГазы F).

На фиг. 3B приведены сайты расщепления для эндогликозидазы F2 и ПНГазы F.

На фиг. 3C приведены сайты расщепления для эндогликозидазы F3 и ПНГазы F.

На фиг. 3D приведены сайты расщепления для эндогликозидазы F4 и ПНГазы F.

Подробное раскрытие изобретения

Обзор.

A. Определения.

B. Обзор.

1. PH20.

a. Гликозилирование.

b. GPI-якорь.

C. Длинные (длинные) растворимые полипептиды PH20.

1. Человеческие полипептиды esPH20.

2. Полипептиды esPH20 других видов.

D. Частично гликозилированные полипептиды PH20.

1. Полипептиды PH20.

2. Укороченные с С-конца полипептиды PH20.

3. Дополнительные модификации.

Конъюгирование с полимерами.

E. Методы получения нуклеиновых кислот, кодирующих длинные растворимые гиалуронидазы PH20 и другие гиалуронидазы PH20, а также самих полипептидов.

1. Векторы и клетки.

2. Экспрессия.

a. Прокариотические клетки.

b. Клетки дрожжей.

c. Клетки насекомых.

d. Клетки млекопитающих.

e. Растения.

3. Способы очистки.

F. Анализы.

1. Гиалуронидазная активность.
 2. Растворимость.
- G. Примеры.
A. Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, как это обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится изобретение. Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности Genbank, базы данных, веб-сайты и другие печатные материалы, упомянутые на протяжении всего приведенного здесь раскрытия, если не указано иное, включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. В случае, если существует множество определений упомянутого в данном изобретении термина, преимущественную силу имеет определение, приведенное в этом разделе. Если в данном изобретении приведена ссылка на URL или другой такой идентификатор или адрес, то подразумевается, что такой идентификатор может измениться и конкретная информация в сети Интернет может появиться и исчезнуть, однако эквивалентную информацию можно найти с помощью функции поиска в Интернете. Такая ссылка свидетельствует о наличии и публичном распространении такой информации.

В настоящем документе гиалуронидазы относятся к классу ферментов, которые разрушают гиалуроновую кислоту. Гиалуронидазы включают, но не ограничиваются, бактериальными гиалуронидазами (ЕС 4.2.2.1 или ЕС 4.2.99.1), гиалуронидазами пиявок, других паразитов и ракообразных (ЕС 3.2.1.36), и гиалуронидазами млекопитающих (ЕС 3.2.1.35). Гиалуронидазы включают любые гиалуронидазы не человеческого происхождения, включая, но не ограничиваясь, мышинными, собачьими, кошачьими, заячьими, птичьими, бычьими, овечьими, свиными, лошадиными, рыбьими, лягушачьими, бактериальными гиалуронидазами, и гиалуронидазами пиявок, других паразитов и ракообразных. Примеры человеческих гиалуронидаз включают HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 и PH20 (SEQ ID NO: 107). Также гиалуронидазы включают растворимые гиалуронидазы, включая баранью и бычью PH20, растворимую человеческую PH20 и gHuPH20. Примеры коммерчески доступных бычьих или овечьих растворимых гиалуронидаз включают гиалуронидазу Vitrase® (овечья гиалуронидаза) и гиалуронидазу Amphadase® (бычья гиалуронидаза).

В настоящем документе PH20 относится к типу гиалуронидазы, который встречается в сперме и активен в нейтральной среде. PH20 локализована на поверхности сперматозоидов, в акросоме лизосомного происхождения, где она связана с внутренней акросомной мембраной. PH20 включают гиалуронидазы любого происхождения, включая, но не ограничиваясь, человеческой гиалуронидазой, гиалуронидазой шимпанзе, обезьяны циномолгус, обезьяны резус, мышинной, бычьей, бараньей гиалуронидазой, гиалуронидазой морской свинки, кроличьей и крысиной гиалуронидазой. Примеры полипептидов PH20 включают гиалуронидазы человека (SEQ ID NO: 107), шимпанзе (SEQ ID NO: 197), обезьяны резус (SEQ ID NO: 198), обезьяны циномолгус (SEQ ID NO: 114), коровы (например, SEQ ID NOS: 111 и 119), мыши (SEQ ID NO: 117), крысы (SEQ ID NO: 116), кролика (SEQ ID NO: 112), овцы (SEQ ID NOS: 113, 118 и 120) и морской свинки (SEQ ID NO: 115). Понятие PH20 включает полипептиды-предшественники PH20 и зрелые полипептиды PH20 (например, полипептиды, в которых удалена сигнальная последовательность), их усеченные формы, обладающие активностью, включает аллельные варианты и видовые варианты, варианты сплайсинга и другие варианты, включая полипептиды с 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности с полипептидом-предшественником, приведенным в SEQ ID NO: 107 и 109, или их зрелые формы. PH20 также включают полипептиды, содержащие химические или посттрансляционные модификации, а также полипептиды без химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются пегилированием, альбуминированием, гликозилированием, фарнезилированием, карбоксилированием, гидроксильным фосфорилированием, а также другими модификациями полипептидов, известными в уровне техники. Усеченные гиалуронидазы PH20 относятся к любой усеченной с С-конца форме гиалуронидазы, в частности, к усеченной и активной в нейтральной среде при наличии N-гликозилирования гиалуронидазе.

В настоящем документе растворимая PH20 относится к любой форме PH20, которая является растворимой в физиологических условиях. Растворимая PH20 может быть идентифицирована, например, по распределению в водную фазу раствора Тритон® X-114 при температуре 37°C (Bordier и др., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7). Заякоренная в мембране PH20, такая как заякоренная липидом PH20, включая GPI-заякоренную PH20, переходит в обогащенную детергентом фазу, но переходит в обедненную детергентом или водную фазу после обработки фосфолипазой-С. Растворимые PH20 включают заякоренные в мембране PH20, в которых один или несколько районов, связанных с заякорением PH20 в мембране, удален или изменен, где растворимая форма сохраняет гиалуронидазную активность. Растворимые PH20 также включают рекомбинантные растворимые PH20 и полипептиды, содержащиеся в природных источниках или очищенные из природных источников, таких как, например, экстракт из овечьих или коровьих яиц. Примером таких растворимых PH20 является растворимая человеческая PH20.

В настоящем документе растворимая человеческая PH20 или sHuPH20 включает полипептиды

RH20, в которых отсутствует вся сигнальная последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря на С-конце или ее часть, так что после экспрессии полипептиды являются растворимыми в физиологических условиях. Растворимость можно оценить с помощью любого подходящего метода, который демонстрирует растворимость в физиологических условиях. Примером такого метода является описанный выше и в Примерах анализ с Тритон® X-114, при котором оценивают распределение полипептида между водной и неполярной фазами. Кроме того, растворимый человеческий полипептид RH20 при получении в клетках CHO, например, клетках CHO-S, экспрессируется и секретируется в культуральную среду. Растворимые человеческие полипептиды RH20, однако, не ограничиваются получаемым в клетках CHO полипептидом, полипептид может быть получен в любом типе клеток или любым другим способом, включая рекомбинантную экспрессию и синтез полипептида. Указание на секрецию в клетках CHO является дефиниционным. То есть, если полипептид может быть экспрессирован и секретирован в клетках CHO и является растворимым, т.е. полипептид переходит в водную фазу при экстракции Тритон® X-114, он представляет собой растворимый полипептид RH20 в не зависимости от того, как он получен. Полипептиды-предшественники полипептидов sHuRH20 могут включать сигнальную последовательность, такую как гетерологичную или не гетерологичную (т.е. нативную) сигнальную последовательность. Примерами предшественников являются полипептиды, которые включают сигнальную последовательность, такую как нативную сигнальную последовательность из 35 аминокислот, соответствующую положениям 1-35 (см., например, аминокислоты 1-35 из SEQ ID NO: 107).

В настоящем документе "длинная растворимая RH20" или "esRH20" включает растворимый полипептид RH20, который включает остатки до сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря и один или несколько последовательно расположенных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, если при этом esRH20 является растворимым при физиологических условиях.

Растворимость в физиологических условиях может быть определена любым способом, известным специалистам в данной области. Например, она может быть оценена с помощью анализа с Тритон® X-114, описанного выше и в Примерах. Кроме того, как уже говорилось выше, растворимая RH20 при получении в клетках CHO, например, клетках CHO-S, представляет собой полипептид, который экспрессируется и секретируется в культуральную среду. Растворимые человеческие полипептиды RH20, однако, не ограничиваются получаемыми в клетках CHO полипептидами, но могут быть получены в любом типе клеток или любым способом, в том числе рекомбинантной экспрессией и полипептидным синтезом. Указание на секрецию в клетках CHO является дефиниционным. То есть, если полипептид может быть экспрессирован и секретирован в клетках CHO и является растворимым, т.е. полипептид переходит в водную фазу при экстракции Тритон® X-114, он представляет собой растворимый полипептид RH20 в не зависимости от того, как он получен. Растворимые человеческие полипептиды esRH20 включают помимо остатков 36-490 одну или несколько последовательно расположенных аминокислот, начиная с позиции 491 из SEQ ID NO: 107, при условии, что полипептид является растворимым. Примеры человеческих растворимых полипептидов esRH20 включают полипептиды с аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотам 36-491, 36-492, 36-493, 36-494, 36-495, 36-496 и 36-497 из SEQ ID NO: 107. Примеры также включают полипептиды с аминокислотной последовательностью, приведенной в любой из SEQ ID NOS: 60-63 и 102-104. Кроме того, примеры включают аллельные варианты и другие варианты с 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% и большей идентичностью последовательности с соответствующими полипептидами из SEQ ID NO: 60-63 и 102-104 при условии сохранения ими активности в нейтральной среде и растворимости. Указание идентичности последовательности относится к вариантам с аминокислотными заменами.

В настоящем документе esRH20 включает предшественников полипептидов esRH20 и зрелые полипептиды esRH20 (в которых удалена сигнальная последовательность), их усеченные формы, которые сохраняют ферментативную активность (сохраняют по меньшей мере 1, 10, 20, 30, 40, 50% или более от активности полноразмерной формы) и которые являются растворимыми, и включает аллельные и видовые варианты, варианты сплайсинга и другие варианты, в том числе полипептиды по меньшей мере с 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью последовательности по сравнению с полипептидом-предшественником, приведенным в SEQ ID NOS: 107 и 109, или его зрелой формой.

В настоящем документе esRH20 также относится к полипептидам с химическими или посттрансляционными модификациями и полипептидам без химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются, пегилированием, альбуминированием, гликозилированием, фарнезилированием, карбоксилированием, гидроксильным фосфорилированием, а также другими модификациями полипептидов, известными в уровне техники.

В настоящем документе растворимая рекомбинантная человеческая RH20 (rHuRH20) относится к растворимой форме человеческой RH20, экспрессированной рекомбинантно и секретированной в клетках яичников китайского хомячка (CHO). Растворимая rHuRH20 кодируется включающей сигнальную последовательность нуклеиновой кислотой, которая приведена в SEQ ID NO: 109. Также предусмотрены молекулы ДНК, представляющие собой ее аллельные варианты, и другие растворимые варианты. Коди-

рующие растворимую gHuPH20 нуклеиновые кислоты экспрессируют в клетках CHO, которые секретируют зрелый полипептид. При получении в культуре наблюдается гетерогенность белка на С-конце, так что продукт представляет собой смесь полипептидов, включающих один или более из полипептидов SEQ ID NO: 122 -SEQ ID NO: 127 в различном количественном соотношении.

Аналогично для других форм PH20, таких как esPH20, рекомбинантно экспрессированные полипептиды и композиции могут включать множество видов полипептидов с гетерогенностью на С-конце. Например, композиции с рекомбинантно экспрессированной esPH20, полученной экспрессией полипептида SEQ ID NO: 8, который кодирует esPH20, включающей аминокислоты 36-497, могут включать формы с меньшим количеством аминокислот, например, 36-496, 36-495.

В настоящем документе N-замещенный остаток относится к аминокислотному остатку аспарагина (N) в полипептиде, который может быть посттрансляционно модифицирован гликозилированием. Примеры N-замещенных остатков в PH20 человека включают аминокислоты N82, N166, N235, N254, N368 и N393 человеческого полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 107.

В настоящем документе N-гликозилированный полипептид относится к полипептиду PH20 или его усеченной форме, содержащим, по меньшей мере, три олигосахарида, присоединенных к N-замещенным остаткам аминокислот, например, N-замещенным остаткам, соответствующим остаткам N235, N368 и N393 из последовательности SEQ ID NO: 107. N-гликозилированный полипептид включает полипептид, в котором к трем, четырем, пяти или всем N-замещенным остаткам присоединены олигосахариды. N-связанные олигосахариды могут включать олигоманнозы, сложные, гибридные или сульфатированные олигосахариды, или другие олигосахариды и моносахариды.

В настоящем документе N-гликозилированный полипептид относится к полипептиду, который содержит, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый гликан, присоединенный, по меньшей мере, к трем N-замещенным остаткам. Частично гликозилированный полипептид может включать различные формы гликанов, в том числе моносахариды, олигосахариды и разветвленные сахара, в том числе образовавшиеся при обработке полипептида EndoH, EndoF1, EndoF2 и/или EndoF3. Расщепление гликанов указанными ферментами представлено, например, на фиг. 2.

В настоящем документе дегликозилированный полипептид PH20 относится к предусмотренному в данном изобретении полипептиду PH20, в котором гликозилированы не все возможные сайты гликозилирования. Дегликозилирование может быть осуществлено, например, удалением сахаров, путем предупреждения гликозилирования или изменением полипептидной цепи для устранения сайтов гликозилирования. Как описано в данном изобретении, некоторые сайты N-гликозилирования не нужны для проявления активности, в то время как другие необходимы.

В настоящем документе связанные с гиалуроновой кислотой заболевания, расстройства или состояния относятся к любому заболеванию или состоянию, при котором в качестве причины, последствия или иного фактора наблюдается повышение уровня гиалуроновой кислоты. Связанные с гиалуроновой кислотой заболевания и состояния сопровождаются повышенной экспрессией гиалуроновой кислоты в тканях или клетках, увеличением давления интерстициальной жидкости, снижением сосудистого объема и/или повышением содержания воды в тканях. Связанные с гиалуроновой кислотой заболевания, нарушения или состояния можно лечить введением композиции, содержащей расщепляющий гиалуронан фермент, такой как гиалуронидазу, например, растворимую гиалуронидазу, причем лечение можно проводить указанной композицией отдельно, либо в сочетании или в дополнение к другому виду лечения и/или агенту. Примеры заболеваний и состояний включают, но не ограничиваются богатыми гиалуроновым раками, например, опухолями, в том числе плотными опухолями, такими как опухоли на поздней стадии рака, метастатическими раками, недифференцированными раками, раком яичников, раком *in situ* (ISC), плоскоклеточным раком (SCC), раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, мелкоклеточным раком легкого, раком молочной железы, раком толстой кишки и другими видами рака. Также примерами связанных с гиалуроновой кислотой заболеваний или состояний являются заболевания, связанные с повышенным давлением интерстициальной жидкости, такие как связанные с внутридисковым давлением заболевания, и отеки, например, отек при пересадке органов, инсульте, травме мозга или другой травме. Примеры связанных с гиалуроновой кислотой заболеваний или состояний включают заболевания и состояния, связанные с повышением давления интерстициальной жидкости, снижением сосудистого объема и/или повышением содержания воды в тканях, включая рак, повышенное внутридисковое давление и отеки. В одном из примеров лечение связанного с гиалуроновой кислотой заболевания, состояния или нарушения приводит к улучшению, уменьшению или другому полезному эффекту по отношению к повышенному давлению интерстициальной жидкости (IFP), сниженному сосудистому объему и повышенному содержанию воды в тканях.

В настоящем документе конъюгат относится к растворимым полипептидам PH20, связанным напрямую или не напрямую с одним или несколькими другими полипептидами или химическими фрагментами. Такие конъюгаты включают слитые белки, полученные химическим конъюгированием или с применением любого другого метода, где, по меньшей мере, один растворимый полипептид PH20 связан напрямую или не напрямую с другим полипептидом или химическим фрагментом, при этом конъюгат сохраняет гиалуронидазную активность. Примеры конъюгатов по настоящему изобретению включают

полипептиды PH20, связанные напрямую или не напрямую с доменом мультимеризации, таким как Fc-фрагмент, токсином, меткой или лекарством.

В настоящем документе белок слияния относится к полипептиду, кодируемому нуклеиновой кислотой, содержащей кодирующую последовательность из одной молекулы нуклеиновой кислоты и кодирующую последовательность из другой молекулы нуклеиновой кислоты, в которой кодирующие последовательности находятся в одной рамке считывания, так что транскрипция и трансляция гибридной конструкции в клетке-хозяине приводит к белку, включающему два белка. Две молекулы могут непосредственно соседствовать в конструкции или могут быть разделены линкерным полипептидом, который содержит 1, 2, 3 или более аминокислот, но обычно менее чем 10, 9, 8, 7 или 6 аминокислот. Белковый продукт, кодируемый гибридной конструкцией, называют белком слияния. Примеры белков слияния включают слитые с Fc белки.

В настоящем документе полимер, конъюгированный с разрушающим гиалуроновую кислоту ферментом, таким как гиалуронидаза, относится к любому полимеру, который ковалентно или иным образом стабильно связан, напрямую или через линкер, с разрушающим гиалуроновую кислоту ферментом. Такие полимеры, как правило, увеличивают период полураспада белка в сыворотке, и включают, но не ограничиваются полимерами из остатков сиаловой кислоты, фрагментами полиэтиленгликоля, декстраном, сахарами и другими фрагментами, например, присоединяемыми при гликозилировании.

В настоящем документе активность относится к функциональной активности или активностям полипептида или его части, связанным с активностью полноразмерного (целого) белка. Функциональная активность включает, но не ограничивается биологической активностью, каталитической и ферментативной активностью, антигенностью (способностью связывать или конкурировать с полипептидом за связывание с антителами против полипептида), иммуногенностью, способностью образовывать мультимеры и способностью специфически связывать рецепторы или лиганды полипептида.

В настоящем документе гиалуронидазная активность относится к способности ферментативно катализировать расщепление гиалуроновой кислоты. В тесте фармакопеи США (USP) XXII издания на гиалуронидазу гиалуронидазную активность определяют косвенно, измеряя оставшееся количество высокомолекулярной гиалуроновой кислоты или гиалуронана в качестве субстрата после проведения ферментативной реакции с ГК в течение 30 мин при 37°C (USP-NF XXII XVII (1990) 644-645, Конвенция о Фармакопее США, Роквилл, штат Мэриленд). Для определения относительной активности любой гиалуронидазы в единицах активности в анализе может быть использован стандартный раствор сравнения. Для определения гиалуронидазной активности гиалуронидаз, например, PH20, в том числе растворимой PH20 и esPH20, известны в уровне техники и описаны здесь *in vitro* анализы. Примеры анализов включают анализ мутности, описанный ниже (см., например, Пример 12), при котором расщепление гиалуроновой кислоты гиалуронидазой измеряют косвенно по нерастворимому осадку, образуемому при связывании нерасщепленной гиалуроновой кислоты с сывороточным альбумином. Для построения стандартной кривой для определения активности исследуемой гиалуронидазы в единицах активности могут быть использованы стандартные образцы.

В настоящем документе активность в нейтральной среде относится к способности полипептида PH20 ферментативно катализировать расщепление гиалуроновой кислоты при нейтральном pH. Активная в нейтральной среде укороченная с C-конца или частично N-гликозилированная PH20 по настоящему документу обладает приблизительно 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% активности или большей активностью по сравнению с гиалуронидазной активностью соответствующей активной в нейтральной среде не укороченной с C-конца или не частично N-гликозилированной PH20.

В настоящем документе сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря является C-концевой аминокислотной последовательностью, которая направляет присоединение предварительно синтезированного GPI-якоря к полипептиду в просвете ЭР. Сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря присутствует в предшественниках полипептидов с GPI-якорем, таких как полипептиды PH20 с GPI-якорем. C-концевая сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря, как правило, содержит преимущественно гидрофобную область из 8-20 аминокислот, которой предшествует гидрофильный спейсер из 8-12 аминокислот, расположенный непосредственно после ω -сайта или сайта присоединения GPI-якоря. Сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря может быть легко идентифицирована с помощью хорошо известных в уровне техники методов. Они включают, но не ограничиваются *in silico* методами и алгоритмами (см., например Udenfriend и др. (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582, Eisenhaber и др., (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 741-758, Kronegg и Buloz, (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)", например, вебсайт 129.194.185.165/dgpi/, Fankhauser и др., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852, Omaetxebarria и др., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960, Pierleoni и др., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), а также протоколы, легко доступные на биоинформатических вебсайтах, таких как вебсайт ExPASy Proteomics tools (вебсайт expasy.ch/tools/).

В настоящем документе бифукозилированный полипептид относится к полипептиду, который включает два остатка фукозы, присоединенных к N-ацетилглюкозаминовому ядру, где один остаток при-

соединен α -1,3-связью, а другой остаток присоединен α -1,6-связью, а N-ацетилглюкозаминный фрагмент связан с остатком аспарагина в полипептидной цепи. Бифукозилированные полипептиды обычно производятся в клетках насекомых.

В настоящем документе нуклеиновые кислоты включают ДНК, РНК и их аналоги, в том числе пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), и их смеси. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. При упоминании зондов или праймеров, необязательно меченых, например, обнаруживаемой меткой, например, люминесцентной или радиоактивной меткой, предусмотрены одноцепочечные молекулы. Длина таких молекул, как правило, достаточна для того, чтобы их мишень при гибридизации или праймировании библиотеки была статистически уникальна или была представлена низким числом копий (обычно менее 5, как правило, менее 3). Обычно зонд или праймер содержит последовательность, по меньшей мере, из 14, 16 или 30 расположенных подряд нуклеотидов, комплементарную или идентичную последовательности представляющего интерес гена. Зонды и праймеры могут включать 10, 20, 30, 50, 100 или более нуклеотидов в длину.

В настоящем документе пептид относится к полипептиду, длина которого больше или равна 2 аминокислотам и меньше или равна 40 аминокислотам.

В настоящем документе аминокислоты, встречающиеся в различных приведенных в данном изобретении последовательностях аминокислот, определяются в соответствии с их известными, трехбуквенными или однобуквенными обозначениями (табл. 1). Нуклеотиды, встречающиеся в различных фрагментах нуклеиновых кислот, обозначены стандартными однобуквенными обозначениями, рутинно употребляемыми в уровне техники.

В настоящем документе термин "аминокислота" относится к органическому соединению, содержащему аминокислотную группу и карбоксильную группу. Полипептид содержит две или более аминокислот. В настоящем изобретении аминокислоты включают двадцать природных аминокислот, не природные аминокислоты и аналоги аминокислот (например, аминокислоты с боковой цепью у α -атома углерода).

В настоящем документе термин "аминокислотный остаток" относится к аминокислоте, образующейся при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида по пептидным связям. Аминокислотные остатки по настоящему документу находятся в "L" изомерной форме. Остатки в "D" изомерной форме, обозначенные таким образом, могут быть заменены на любой остаток L-аминокислоты, если при этом полипептид сохраняет желаемое свойство. NH_2 относится к свободной аминокислотной группе, присутствующей на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида. Аббревиатуры для обозначения аминокислотных остатков, соответствующие стандартной полипептидной номенклатуре, описанной в J. Biol. Chem, 243. 3557-3559 (1968) и принятой 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, приведены в табл. 1:

Таблица 1. Таблица соответствия

Символ		
Однобуквенное обозначение	Трехбуквенное обозначение	Аминокислота
Y	Tyr	тирозин
G	Gly	глицин
F	Phe	фенилаланин
M	Met	метионин
A	Ala	аланин
S	Ser	серин
I	Ile	изолейцин
L	Leu	лейцин
T	Thr	валин
V	Val	треонин
P	Pro	пролин
K	Lys	лизин
H	His	гистидин
Q	Gln	глутамин
E	Glu	глутаминовая кислота
Z	Glx	Gln и/или Glu
W	Trp	триптофан
R	Arg	аргинин
D	Asp	аспарагиновая кислота
N	Asn	аспарагин
B	Asx	Asn и/или Asp
C	Cys	цистеин
X	Xaa	неизвестная или другая

Все последовательности аминокислотных остатков представлены в данном изобретении в виде формул при ориентации слева направо в обычном направлении от аминоконца к карбоксильному концу. Термин "аминокислотный остаток" включает аминокислоты, перечисленные в таблице соответствия (табл. 1), и модифицированные и необычные аминокислоты, такие как указанные в приведенных здесь в качестве ссылки §§ 1.821-1.822 37 C.F.R. аминокислоты. Кроме того, следует отметить, что тире в начале или в конце последовательности аминокислотных остатков обозначает пептидную связь с последовательностью из одного или более аминокислотных остатков, связь с аминоконцевой группой, такой как NH_2 , или карбоксильной концевой группой, такой как COOH .

В настоящем документе термин "природные α -аминокислоты" относится к остаткам 20 α -аминокислот, встречающихся в природе, которые включаются в белок посредством специфического распознавания кодона мРНК молекулой тРНК, несущей остаток аминокислоты. Не встречающиеся в природе аминокислоты включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличающиеся от 20 природных аминокислот и включающие, но не ограничивающиеся D-изостереомерами аминокислот. Примеры неприродных аминокислот описаны в данном изобретении и известны специалистам в данной области.

В настоящем документе ДНК-конструкция представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит фрагменты ДНК, комбинированные и соединенные в неприродном порядке. ДНК-конструкции существуют как результат человеческой манипуляции и включают клоны и другие копии искусственных молекул.

В настоящем документе фрагмент ДНК представляет собой часть более крупной молекулы ДНК с определенными атрибутами. Например, фрагмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, представляет собой часть большей молекулы ДНК, такой как плазмида или фрагмент плазмиды, который при чтении от 5' к 3' кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

В настоящем документе термин полинуклеотид означает одноцепочечный или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидных оснований, читаемый от 5' к 3' концу. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК, и могут быть выделены из природных источников, синтезированы *in vitro* или получены комбинацией натуральных и синтетических молекул. Длину полинуклеотидных молекул в данном изобретении приводят в нуклеотидах (сокращенно "нт") или парах оснований (сокращенно "по"). Определение длины в нуклеотидах применяют для одноцепочечных и двухцепочечных молекул, где позволяет контекст. Когда термин применяют к двухцепочечной молекуле, он употребляется для обозначения общей длины и эквивалентен термину пара оснований. Специалисту в данной области техники очевидно, что две цепи двухцепочечного полинуклеотида могут незначительно отличаться по длине и что концы их могут быть расположены уступом, поэтому не все нуклеотиды в двухцепочечной молекуле полинуклеотида могут образовывать пары. Такие непарные концы, как правило, не превышают в длину 20 нуклеотидов.

В настоящем документе "сходство" между двумя белки или нуклеиновыми кислотами относится к подобию аминокислотных последовательностей белков или нуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот. Сходство может быть определено по степени идентичности и/или гомологии последовательностей остатков и самих содержащихся в них остатков. Методы оценки степени сходства белков или нуклеиновых кислот хорошо известны специалистам в данной области. Например, в одном методе оценки сходства последовательностей две аминокислотные или нуклеотидные последовательности выравнивают таким образом, чтобы достичь максимального уровня идентичности между последовательностями. "Идентичность" относится к степени, в которой аминокислотные или нуклеотидные последовательности инвариантны. При выравнивании аминокислотных последовательностей, и в некоторой степени нуклеотидных последовательностей, также возможно учитывать консервативные различия и/или частые замены аминокислот (или нуклеотидов). Различия являются консервативными при сохранении физико-химических свойств участвующих остатков. Выравнивание может быть глобальным (выравнивание сравниваемых последовательностей по всей длине последовательностей, включая все остатки) или локальным (выравнивание частей последовательностей, которые включают только наиболее близкие район или районы).

"Идентичность" имеет признанное в данной области значение и может быть рассчитана с применением опубликованных методов. (См., например, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M, изд. Oxford University Press, Нью-Йорк, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., изд. Academic Press, Нью-Йорк, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, часть I, Griffin, A.M. и Griffin, H.G., изд. Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., изд. M Stockton Press, New York, 1991). Хотя существует множество методов определения идентичности между двумя полинуклеотидами или полипептидами, термин "идентичность" хорошо известен квалифицированному специалисту (Carillo, H., Lipton, D., *SIAM J Applied Math* 48:1073 (1988)).

В настоящем документе термин гомологичный (по отношению к последовательностям нуклеиновых кислот и/или аминокислот) означает большую или равную приблизительно 25% гомологию последовательностей, как правило, большую или равную 25, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 или 95% гомологию по-

следовательностей; точный процент может быть указан, если это необходимо. В настоящем документе термины "гомология" и "идентичность" часто являются взаимозаменяемыми, если отдельно не указано иное. Как правило, для определения процента гомологии или идентичности последовательности выравнивают для достижения наибольшего совпадения остатков (см., например, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., изд. Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., изд. Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, часть I, Griffin, A.M. и Griffin, H.G., изд. Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. и Devereux, J., изд. M Stockton Press, New York, 1991; Carillo и др. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Для определения гомологии последовательностей количество консервативных аминокислот определяют с помощью стандартных алгоритмов программ выравнивания, при этом могут быть использованы установленные по умолчанию штрафы за разрыв, предусмотренные поставщиком программного обеспечения. Существенно гомологичные молекулы нуклеиновых кислот гибридизуются, как правило, при умеренно жестких условиях или при высоко жестких условиях по всей длине интересующих нуклеиновых кислот. Также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, которые включают вырожденные кодоны вместо кодонов в гибридизующихся молекулах нуклеиновых кислот.

"Идентичность" или "гомология" нуклеотидных последовательностей или аминокислотных последовательностей любых двух молекул, по меньшей мере, на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% может быть определена с помощью известных компьютерных алгоритмов, таких как программа "FASTA", с использованием, например, параметров по умолчанию, как указано Pearson и др. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (другие программы включают пакет программ GCG (Devereux, J. и др., *Nucleic Acids Research* 12(1):387 (1984)), программы BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F. и др., *J Mol Biol* 215:403 (1990)); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, изд. Academic Press, San Diego, 1994 и Carillo и др. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Например, для определения идентичности может быть использована функция BLAST базы данных Национального центра биотехнологической информации. Другие коммерчески или публично доступные программы включают программу "MegAlign" от DNASTar (Мэдисон, Висконсин) и программу "Gap", разработанную компьютерной группой генетики Университета Висконсин (UWG) (Мэдисон, Висконсин). Процент гомологии или идентичности белков и/или молекул нуклеиновых кислот можно определить, например, путем сравнения их последовательностей с применением компьютерной программы GAP (см., например, Needleman и др. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с изменениями от Smith и Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). Программа GAP определяет сходство как отношение количества выровненных символов (например, нуклеотидов или аминокислот), которые являются идентичными, к общему числу символов в более короткой из двух последовательностей. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) унарную матрицу сравнения (содержащую значение 1 для идентичных символов и 0 для не идентичных) и взвешенную матрицу сравнения Gribskov и др., (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, как описано Schwartz и Dayhoff в атласе белковых последовательностей и структур *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, с 353-358 (1979), (2) штраф в размере 3,0 для каждого разрыва и дополнительный штраф 0,10 для каждого символа в каждом разрыве; и (3) штраф не применяют для разрывов на концах.

Таким образом, в данном изобретении термины "идентичность" или "гомология" относятся к сравнению исходного и исследуемого полипептида или полинуклеотида. В настоящем документе термин "по меньшей мере, на 90% идентичны" относится к проценту идентичности от 90 до 99,99 по отношению к исходной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности полипептида. Принимая для иллюстративных целей длину сравниваемого и исходного полипептидов в 100 аминокислот, идентичность на уровне 90% и более свидетельствует о том, что не более 10% аминокислот (т.е. 10 из 100 аминокислот) в исследуемом полипептиде отличается от исходного полипептида. Подобное сравнение можно провести между исследуемым и исходным полинуклеотидами. Такие различия могут быть представлены в виде точечных мутаций, случайным образом распределенных по всей длине полипептидной цепи, или они могут быть сосредоточены в одном или нескольких районах цепи различной длины вплоть до максимально допустимой, например, 10/100 отличающихся аминокислот (приблизительно, 90% идентичности). Отличия определяются как замены, вставки или делеции нуклеотидов или аминокислот. При уровне гомологии или идентичности выше приблизительно 85-90% результат не должен зависеть от выбранной программы и параметров штрафов за разрыв; такие высокие уровни идентичности могут быть легко оценены, часто с помощью ручного выравнивания без помощи программного обеспечения.

В настоящем документе выравнивание последовательностей относится к использованию гомологии (сходства и/или идентичности) для выравнивания соответствующих позиций в нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Как правило, две или более последовательностей, которые связаны 50% и большей идентичностью, выравниваются. Набор выровненных последовательностей относится к 2 или большему количеству последовательностей, которые выровнены в соответствующих позициях, и может включать последовательности, полученные на основе РНК, такие как EST и другие кДНК, выровненные с последовательностью геномной ДНК.

В настоящем документе "праймер" относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые в соответствующих условиях (например, в присутствии четырех различных нуклеозидтрифосфатов и полимеризующего агента, такого как ДНК-полимераза, РНК-полимераза или обратная транскриптаза) в соответствующем буфере и при подходящей температуре могут выступать в качестве точки начала направляемого матрицей синтеза ДНК. Следует иметь в виду, что определенные молекулы нуклеиновых кислот могут служить в качестве "зонда" и в качестве "праймера". Праймеры, однако, имеют на конце 3' гидроксильную группу для удлинения. Праймеры могут быть использованы для осуществления разнообразных методов, включая, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT)-ПЦР, ПЦР на РНК, ЛЦР, мультиплексную ПЦР, супрессионную ПЦР, ПЦР с захватом, ПЦР с экспрессией, 3' и 5' RACE (быстрая амплификация концов кДНК), *in situ* ПЦР, ПЦР с лигированием и другие протоколы амплификации.

Используемый в данном изобретении термин "пары праймеров" относится к набору праймеров, который включает 5' праймер (вышерасположенный), который гибридизуется с 5' концом амплифицируемой (например, методом ПЦР) последовательности, и 3' праймер (нижерасположенный), который гибридизуется с 3' концом амплифицируемой последовательности.

В настоящем документе термин "специфически гибридизуется" относится к отжигу оснований молекулы нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотида) с целевой молекулой нуклеиновой кислоты через комплементарное спаривание. Специалистам в данной области известны *in vitro* и *in vivo* параметры, которые влияют на специфическую гибридизацию, такие как длина и состав конкретной молекулы. Особенно важные для *in vitro* гибридизации параметры дополнительно включают температуру отжига и отмывания, состав буфера и концентрацию соли. Примеры условий отмывания для удаления неспецифически связанных молекул нуклеиновых кислот включают 0,1×SSPE, 0,1% SDS и 65°C при высокой жесткости и 0,2×SSPE, 0,1% SDS и 50°C при умеренной жесткости. Эквивалентные условия известны в уровне техники. Специалист в данной области для достижения специфической гибридизации молекул нуклеиновой кислоты с целевыми молекулами нуклеиновой кислоты может легко изменить условия для конкретной задачи. При упоминании двух молекул нуклеиновых кислот комплементарность означает, что две нуклеотидные последовательности способны гибридизоваться, как правило, при наличии 25%, 15% или 5% не совпадающих нуклеотидов. При необходимости может быть точно указан процент комплементарности. Как правило, две молекулы выбирают таким образом, что они гибридизуются при жестких условиях.

В настоящем документе термин "в значительной степени идентичный" по отношению к продукту означает достаточно близкий продукт, в котором интересующее свойство является в значительной степени неизменным, поэтому в значительной степени идентичный продукт может быть использован вместо исходного продукта.

В настоящем документе термины "в значительной степени идентичные" или "сходные" варьируются в зависимости от контекста, как это понимает специалист в данной области техники.

В настоящем документе "аллельный вариант" или "аллельные различия" относятся к любой из двух или более альтернативных форм гена, занимающих один хромосомный локус. Аллельные различия естественно возникают в результате мутаций и могут привести к фенотипическому полиморфизму в популяциях. Генные мутации могут быть молчащими (без изменений в закодированном полипептиде) или могут приводить к полипептидам с измененной аминокислотной последовательностью. Термин "аллельный вариант" также используется здесь для обозначения белка, кодируемого аллельными вариантами гена. Обычно образцовая форма гена кодирует полипептид дикого типа и/или преобладающую форму полипептида в популяции или у одного представителя вида. Как правило, аллельные варианты, которые включают варианты между видами и внутри видов, обладают по меньшей мере 80, 90% или большей идентичностью аминокислотной последовательности с формой дикого типа и/или преобладающей формой у того же вида, причем степень идентичности зависит от гена и от того, является сравнение межвидовым или внутривидовым. Как правило, внутривидовые аллельные варианты обладают по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 95% или большей идентичностью с формой дикого типа и/или преобладающей формой, в том числе 96, 97, 98, 99% или большей идентичностью с формой дикого типа и/или преобладающей формой полипептида. Упоминание аллельного варианта в данном изобретении обычно относится к различиям в белках между представителями одного и того же вида.

Используемый здесь термин "аллель" является взаимозаменяемым с термином "аллельный вариант" и относится к альтернативным формам генов или их частей. Аллели занимают одинаковый локус или позицию в гомологичных хромосомах. Когда субъект имеет два одинаковых аллеля гена, субъект называется гомозиготным субъектом по этому гену или аллелю. Когда субъект имеет два различных аллеля гена, субъект называется гетерозиготным по гену. Аллели конкретного гена могут отличаться друг от друга одним нуклеотидом или несколькими нуклеотидами и могут включать изменения, такие как замены, делеции и вставки нуклеотидов. Аллель гена также может быть одной из форм гена, содержащего мутацию.

В настоящем документе "видовой вариант" относится к вариантам полипептида среди различных

видов, включая различные виды млекопитающих, такие как мышь и человек. Примеры видовых вариантов, предусмотренных в данном изобретении, включают РН20 приматов, включая, но не ограничиваясь, человеком, шимпанзе, макакой и обезьяной циномолгус. Как правило, видовые варианты обладают 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97% или 98% идентичностью последовательности. Соответствующие остатки у межвидовых вариантов и среди видовых вариантов могут быть определены путем сравнения и выравнивания последовательностей для достижения максимального числа соответствующих нуклеотидов или остатков, например, при идентичности между последовательностями 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более. Интересующему положению затем присваивают номер по сравниваемой молекуле нуклеиновой кислоты. Выравнивание может осуществляться вручную, особенно при уровне идентичности последовательностей, превышающем 80%. Например, представленное на фиг. 1 выравнивание показывает, что аминокислотный остаток 491 человеческой РН20 соответствует аминокислотному остатку 491 РН20 шимпанзе и аминокислотный остаток 497 человеческой РН20 соответствует аминокислотному остатку 498 РН20 шимпанзе.

В настоящем документе "вариант сплайсинга" относится к варианту, образованному в результате различного процессинга первичного транскрипта геномной ДНК, что приводит более чем к одному типу мРНК.

Используемый здесь термин "промотор" означает часть гена, содержащую последовательность ДНК, которая обеспечивает связывание РНК-полимеразы и инициацию транскрипции. Промоторная последовательность обычно, но не всегда, находится в 5'-некодирующей области гена.

В настоящем документе "выделенный" или "очищенный" полипептид или белок или его биологически активная часть практически не содержит клеточного материала или других загрязняющих белков из клеток или тканей, из которых происходит белок, или является в значительной степени свободным от химических веществ-предшественников и других химических веществ при его химическом синтезе. Препараты могут быть определены как существенно чистые, если они являются свободными от легко обнаруживаемых примесей, определяемых с помощью стандартных способов анализа, таких как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемых специалистами в области техники для оценки чистоты, или препараты могут быть определены как достаточно чистые, если дальнейшая очистка не изменяет физические и химические свойства вещества, такие как энзиматическая и биологическая активность. Способы очистки соединений для получения существенно химически чистых соединений известны специалистам в данной области. Существенно химически чистые соединения, однако, могут представлять собой смесь стереоизомеров. В таких случаях дополнительная очистка может увеличить удельную активность соединения.

Таким образом, упоминание существенно очищенного полипептида, например, существенно очищенного длинного растворимого РН20, относится к препаратам белка РН20, которые практически не содержат клеточного материала и включают препараты белков, в которых белок отделен от компонентов клеток, из которых был выделен, или в которых получен рекомбинантно. В одном варианте термин "практически не содержащий клеточного материала" относится к препаратам белков-ферментов, содержащим менее чем приблизительно 30% (по сухому весу) белков не ферментов (также называемых в данном изобретении загрязняющими белками), как правило, содержащим менее 20% белков не ферментов, 10% белков не ферментов или менее чем приблизительно 5% белков не ферментов. Если белок-фермент получен рекомбинантно, препарат должен практически не содержать культуральной среды, т.е. содержание культуральной среды составляет менее приблизительно 20%, 10% или 5% от объема препарата белка-фермента.

Используемый здесь термин "практически не содержит химических веществ-предшественников и других химических веществ" относится к препарату фермента, в котором белок отделен от химических веществ-предшественников и других химических веществ, которые использовали в синтезе белка. Этот термин включает препараты фермента, содержащие менее 30% (на сухой вес), 20, 10, 5% или менее химических веществ-предшественников или химических веществ и компонентов, не являющихся ферментом.

В настоящем документе термин "синтетический", употребляемый, например, по отношению к синтетическим молекулам нуклеиновой кислоты, синтетическим генам или синтетическим пептидам относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, которые получают с помощью рекомбинантных методов и/или методов химического синтеза.

В настоящем документе "получение рекомбинантными методами или с помощью методов рекомбинантной ДНК" означает использование известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

В настоящем документе "вектор" (или плаزمид) относится к дискретному элементу, который используется для введения гетерологичных нуклеиновых кислот в клетки для их экспрессии или репликации. Векторы обычно остаются в эпизомном состоянии, но могут быть разработаны векторы для интеграции гена или его части в хромосому генома. Также предусмотрены векторы, которые представляют собой искусственные хромосомы, такие как бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Процедуры выбора и использования

таких векторов хорошо известны специалистам в данной области.

В настоящем документе "вектор экспрессии" включает векторы, способные экспрессировать ДНК, функционально связанную с регуляторными последовательностями, такими как промоторные районы, которые способны вызывать экспрессию таких фрагментов ДНК. Дополнительные последовательности могут включать промоторные и терминаторные последовательности и, при необходимости, могут включать одну или несколько точек начала репликации, один или более маркеров для отбора, энхансер, сигнал полиаденилирования и тому подобное. Векторы экспрессии обычно получают из плазмидной или вирусной ДНК, или вектор может содержать элементы того и другого. Таким образом, вектор экспрессии относится к рекомбинантным ДНК или РНК конструкциям, например, плазмидам, бактериофагам, рекомбинантным вирусам или другим векторам, которые после введения в соответствующую клетку-хозяина приводят к экспрессии клонированной ДНК. Соответствующие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области и включают векторы, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, векторы, которые остаются в эпизомном состоянии, или векторы, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

В настоящем документе вектор также включает "вирусный вектор" или "вирусные векторы". Вирусные векторы представляют собой сконструированные вирусы, функционально связанные с экзогенным геном для передачи (как носитель или челнок) экзогенного гена в клетки.

В настоящем документе термины "функционально" или "функционально связанный" по отношению к сегментам ДНК означают, что сегменты расположены так, что они функционируют в соответствии с их назначением, например, транскрипция инициируется после промотора и до начала любой транскрибируемой последовательности. Промотор, как правило, представляет собой домен, с которым, начиная транскрипцию, связывается транскрипционный комплекс, который затем проходит через кодирующий сегмент до терминатора.

В настоящем документе термин "оценка" относится к качественному и количественному определению абсолютного значения активности белка или его домена, присутствующих в образце, а также к получению индекса, коэффициента, процента, визуального показателя или другого показателя уровня активности. Оценка может быть прямой или косвенной, и химические вещества, определяемые в процессе исследования, не обязательно должны представлять собой непосредственно продукт реакции, но могут представлять собой, например, производные или некоторые дополнительные вещества. Например, обнаружение продукта расщепления белка комплемента можно проводить, например, с помощью SDS-PAGE и окрашивания белка Кумасси синим.

Используемый здесь термин "биологическая активность" относится к активности соединения *in vivo* или к физиологической реакции, которая проявляется при *in vivo* введении соединения, композиции или другой смеси. Биологическая активность, таким образом, охватывает терапевтический эффект и фармацевтическую активность таких соединений, композиций и смесей. Биологическую активность можно наблюдать в *in vitro* системах, предназначенных для исследования или использования такой активности. Таким образом, например, биологическая активность протеазы представляет собой ее каталитическую активность, при которой происходит гидролиз полипептида.

Используемый в данном изобретении термин "эквивалент" в отношении двух последовательностей нуклеиновых кислот означает, что две интересующие последовательности кодируют одну последовательность аминокислот или эквивалентные белки. Термин "эквивалент" в отношении двух белков или пептидов означает, что два белка или пептида обладают в значительной степени одинаковой аминокислотной последовательностью и включают только такие аминокислотные замены, которые существенно не изменяют активности или функции белка или пептида. Термин "эквивалент" в отношении свойства не обязательно означает, что свойство присутствует в той же степени (например, два пептида могут проявлять одну ферментативную активность при разной скорости катализа), но при этом активность, как правило, остается в значительной мере одинаковой.

В настоящем документе термины "модулирует" и "модуляция" или "изменяет" относятся к изменению активности молекулы, такой как белок. Примеры активности включают, но не ограничиваются биологической активностью, такой как передача сигнала. Модуляция может включать повышение активности (т. е. усиление активности или агонистическую активность), снижение активности (т. е. ослабление активности или ингибирование) или любые другие изменения активности (такие как изменения периодичности, частоты, длительности, кинетики или другого параметра). Термин "модуляция" зависит от контекста, как правило, модуляция относится к изменению параметра одного объекта по сравнению с другим указанным объектом, например, белком дикого типа, белком в основном состоянии или белком, экспрессируемым в указанном типе клеток или при определенном состоянии.

В настоящем документе "композиция" относится к любой смеси. Композиция может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, может быть водной или неводной или представлять собой комбинацию указанных типов.

В настоящем документе "комбинация" относится к любому соединению двух или более элементов. Комбинация может представлять собой два или более отдельных элемента, таких как две композиции или две совокупности, может представлять собой их смесь, например смесь двух или более элементов,

или любые их вариации. Элементы комбинации, как правило, функционально связаны или сходны.

Используемый здесь термин "заболевание или нарушение" относится к патологическим состояниям организма, которые возникли в результате факторов или состояний, включающих, но не ограничивающихся инфекцией, приобретенными состояниями, генетическими состояниями, и характеризуются идентифицируемыми симптомами. Заболевания и нарушения в данном изобретении включают заболевания и нарушения, связанные с компонентами ЕСМ (внеклеточного матрикса).

В настоящем документе "лечение" субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы субъекта частично или полностью облегчаются или остаются неизменными после лечения. Поэтому лечение включает профилактику, процесс лечения и/или излечение. Профилактика относится к предотвращению возможного заболеваний и/или предотвращению ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания. Лечение также включает любое фармацевтическое применение предусмотренных здесь композиций.

В настоящем документе "фармацевтически эффективный агент" включает любое терапевтическое средство или биологически активное вещество, включая, но не ограничиваясь, например, анестетиками, вазоконстрикторами, диспергирующими агентами, обычными терапевтическими препаратами, включая низкомолекулярные препараты, например, бисфосфонаты, и терапевтические белки, например, инсулин, молекулы IgG и другие антитела.

В настоящем документе "лечение" представляет собой любой способ уменьшения или иного благотворного изменения симптомов состояния, расстройства или заболевания.

В настоящем документе "терапевтический эффект" представляет собой эффект лечения субъекта, который заключается в изменении, как правило, улучшении или смягчении симптомов заболевания или состояния, или заключается в излечении заболевания или состояния. Терапевтически эффективное количество относится к количеству композиции, молекулы или соединения, которое приводит к терапевтическому эффекту после введения субъекту.

Используемый здесь термин "субъект" относится к животному, в том числе млекопитающему, такому как человек.

В настоящем документе термин "пациент" относится к человеческому субъекту, проявляющему симптомы заболевания или расстройства.

В настоящем документе "улучшение симптомов заболевания или расстройства" посредством лечения, например, фармацевтической композицией или лекарственным средством, относится к любому уменьшению симптомов, постоянному или временному, устойчивому или кратковременному, связанному с введением или приписываемому введению композиции или лекарственного средства.

В настоящем документе "профилактика" или "предотвращение" относится к способам уменьшения риска развития заболевания или состояния.

В настоящем документе "терапевтически эффективное количество соединения или композиции" представляет собой количество, которое является достаточным для проявления терапевтического эффекта. Указанное количество необходимо для предотвращения, лечения, смягчения, устранения или частичного устранения симптомов заболевания или нарушения.

В настоящем документе "единичная дозированная форма" относится к физически дискретным единицам, пригодным для человека и животных, содержащимся в индивидуальной упаковке, как известно в уровне техники.

В настоящем документе "единичная дозированная композиция" относится к композиции для непосредственного введения.

В настоящем документе "изделие" представляет собой продукт, который изготавливается и продается. В настоящем документе термин охватывает терапевтический агент, используемый совместно с PH20, таким как esPH20, или esPH20 отдельно, содержащиеся в одной или отдельных упаковках.

В настоящем документе "жидкая композиция" относится к любой композиции, которая может течь. Таким образом, жидкие композиции включают композиции в полутвердой форме, пасты, растворы, водные смеси, гели, лосьоны, кремы и другие подобные композиции.

В настоящем документе "набор" относится к комбинации предусмотренных в данном изобретении композиций и другого объекта, предназначенного, например, для восстановления и активации, относится к комбинации предусмотренных в данном изобретении композиций и приборов/устройств для доставки, введения, диагностики и оценки биологической активности или свойства. Наборы необязательно включают инструкции по использованию.

В настоящем документе "клеточный экстракт" или "лизат" относится к смеси или фракции, которая состоит из лизированных или разрушенных клеток.

В настоящем документе "животное" включает любое животное, включая, но не ограничиваясь приматами, например, человеком, гориллой и низшими приматами, грызунами, такими как мыши и крысы, птицами, такими как куры, жвачными животными, например, козами, коровами, оленями, овцами, свиньями, и другими животными. Термин "животные, не представляющие собой человека", исключает человека из круга предусмотренных животных. Ферменты, предусмотренные здесь, представляют собой ферменты из любого источника, включая животных, растения, прокариоты и грибы. Большая часть фер-

ментов представляют собой ферменты животного происхождения, в том числе ферменты млекопитающих.

В настоящем документе "контроль" относится к образцу, который в значительной мере идентичен исследуемому образцу, за исключением того, что он не обладает в какой-то мере исследуемым параметром, или, если речь идет об образце плазмы, контроль может быть взят у нормального добровольца, не затронутого интересующим состоянием. Контроль также может представлять собой внутренний контроль.

В настоящем документе упоминание понятий в единственном числе также включает множественное число, если контекст с очевидностью не указывает на иное. Таким образом, например, упоминание молекулы, включающей "внеклеточный домен" относится к молекулам с одним или несколькими внеклеточными доменами.

В настоящем документе диапазоны и количества могут быть обозначены как конкретные значения с добавлением термина "приблизительно". Термин приблизительно также включает в себя точное значение. Следовательно, "приблизительно 5 оснований" означает "приблизительно 5 оснований", а также "5 оснований".

В настоящем документе термины "по желанию" или "необязательно" означают, что описанные явления или обстоятельства могут иметь место или могут не иметь места, и что описание включает случаи, когда указанное явление или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не так. Например, необязательно замещенная группа означает, что группа не является замещенной или является замещенной.

В настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, употребляются в соответствии с их обычным использованием и являются признанными аббревиатурами, или употребляются в соответствии с Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (см., (1972) Biochem. 11: 1726).

В. Обзор.

Гиалуронидазы представляют собой ферменты, которые катализируют гидролиз гиалуроновой кислоты, тем самым снижая вязкость гиалуроновой кислоты и увеличивая проницаемость тканей. PH20 является активной в нейтральной среде и активной в кислой среде гиалуронидазой, демонстрирующей оптимальную активность при гликозилировании. Человеческая PH20 является белком с GPI-якорем, который присоединяется к внеклеточной поверхности плазматической мембраны через гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь на С-конце белка. Присоединение GPI-якоря ко всем белкам с GPI-якорем происходит после расщепления полипептидной цепи по определенной аминокислотной позиции, называемой ω -сайтом (как правило, сайт расположен приблизительно в 20-30 аминокислотах от С-конца) и удаления С-концевой части белка в ЭР. Указанная удаляемая С-концевая часть представляет собой сигнальную последовательность присоединения GPI-якоря. Сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря человеческого PH20 соответствует положению 491-509 аминокислотной последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107, ω -сайт находится в положении 490. Полипептиды PH20 с GPI-якорем, такие как человеческая PH20, являются связанными с мембраной белками и, следовательно, не являются растворимыми. Нерастворимые формы PH20, как правило, не подходят для применения в терапевтических целях.

Полипептиды PH20 без GPI-якоря обычно секретируются клетками при экспрессии, поскольку они не содержат сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, которая закрепляет полипептид на мембране. Авторы изобретения обнаружили, что растворимые формы PH20 также включают белки, которые содержат аминокислотные остатки из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Длинные растворимые полипептиды PH20 (esPH20) представляют собой растворимые белки PH20, укороченные с С-конца, но сохраняющие один или более аминокислотных остатков, расположенных в сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря соответствующего полипептида PH20 дикого типа. Такие полипептиды esPH20 растворимы и могут быть использованы в качестве терапевтических полипептидов, например, для лечения связанных с гиалуроновой кислотой заболеваний или состояний, и/или могут быть использованы в качестве диспергирующего агента или агента для распространения с целью усиления, улучшения или увеличения распространения и доставки других агентов, лекарств и белков, улучшая таким образом фармакокинетический и фармакодинамический профиль совместно вводимого агента, лекарственного средства или белка.

1. PH20.

PH20, также известный как поверхностный белок сперматозоидов, молекула адгезии сперматозоидов 1, SPAM1 или HYAL3, представляет собой гиалуронидазу. Гиалуронидазы представляют собой семейство ферментов, которые разрушают гиалуроновую кислоту (также известную как гиалуронан, гиалуронат или ГК), являющуюся одним из важнейших компонентов внеклеточного матрикса и основным составляющим интерстициального барьера. Катализируя гидролиз гиалуроновой кислоты, гиалуронидазы снижают вязкость гиалуроновой кислоты, тем самым повышая проницаемость тканей. Вследствие этого гиалуронидазы применяли, например, в качестве агентов для распространения или диспергирующих агентов в сочетании с другими агентами, лекарствами и белками для усиления их распространения и

доставки, а также для улучшения фармакокинетического и фармакодинамического профиля совместно вводимого агента, лекарства или белка.

PH20, как и другие гиалуронидазы млекопитающих, представляет собой эндо-P-N-ацетилгексозаминидазу, которая гидролизует $\beta 1 \rightarrow 4$ гликозидные связи гиалуроновой кислоты в олигосахаридах различной длины, таких как тетрасахариды и гексасахариды. PH20 обладает гидролитической и трансгликозидазной активностями и может разрушать гиалуроновую кислоту и хондроитин сульфаты, такие как C4-S и C6-S. В организме PH20 участвует в адгезии сперматозоида к яйцеклетке и посредством расщепления гиалуроновой кислоты способствует проникновению сперматозоидов сквозь слой кумулюсных клеток. PH20 находится на поверхности сперматозоидов и в акросоме лизосомального происхождения, где белок присоединен к внутренней акросомной мембране. PH20 плазматической мембраны проявляет гиалуронидазную активность только при нейтральном pH, в то время как PH20 внутренней акросомной мембраны проявляет активность при нейтральном и кислом pH. В дополнение к тому, что PH20 является гиалуронидазой, белок также представляет собой рецептор для ГК-индуцированной клеточной сигнализации, а также рецептор для зоны pellucida, окружающей ооцит.

Примеры PH20 белков включают, но не ограничиваются PH20 человека (полипептид-предшественник приведен в SEQ ID NO: 107, зрелый полипептид приведен в SEQ ID NO: 108), бычьим PH20 (SEQ ID NOS: 111 и 119), кроличьим (SEQ ID NO: 112), овечьим PH20 (SEQ ID NOS: 113, 118 и 120), PH20 обезьяны циномолгус (SEQ ID NO: 114), PH20 морской свинки (SEQ ID NO: 115), крысы (SEQ ID NO: 116), мыши (SEQ ID NO: 117), шимпанзе (SEQ ID NO: 197) и макаки резус (SEQ ID NO: 198). мРНК транскрипт PH20 человека, как правило, транслируется с образованием белка-предшественника из 509 аминокислот (SEQ ID NO: 107), содержащим сигнальную последовательность из 35 аминокислот на N-конце (аминокислотные остатки 1-35 из SEQ ID NO: 107). Таким образом, после транспорта в ЭР и удаления сигнального пептида образуется зрелый полипептид из 474 аминокислот с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 108. Затем, как описано ниже, в ЭР отщепляется C-концевой пептид, что облегчает ковалентное присоединение GPI-якоря к новообразованной C-концевой аминокислоте в положении, соответствующем позиции 490 аминокислотной последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107.

PH20 человека является прототипом активной в нейтральной среде гиалуронидазы, которая, как правило, связана с мембраной через гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь. Как отмечалось выше, PH20 также экспрессируется на внутренней поверхности акросомной мембраны, где она проявляет гиалуронидазную активность при нейтральном и кислом pH. Опыт показывает, что район 1 пептида PH20, который соответствует аминокислотам 142-172 последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107, требуется для активности фермента при нейтральном pH. Район 3 пептида, который соответствует аминокислотам 277-297 последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107, как представляется, важен для активности фермента при кислом pH (Cheng и др., (2001) *Matrix Biology* 20:515-525). Таким образом, создается впечатление, что PH20 содержит два каталитических центра. В дополнение к каталитическим центрам PH20 также содержит гиалуронан-связывающий участок. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что этот участок находится в районе 2 пептида, который соответствует аминокислотным позициям 205-235 аминокислотной последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107. Указанный район является высококонсервативным среди гиалуронидаз и похожим на связывающий гепарин мотив.

а. Гликозилирование.

Гликозилирование, в том числе N- и O-гликозилирование некоторых деградирующих гиалуронан ферментов, в том числе гиалуронидаз, может иметь большое значение для их каталитической активности и стабильности. N-связанные олигосахариды делятся на несколько основных типов (олигоманнозы, сложные и гибридные), все указанные типы включают (Man)₃-GlcNAc-GlcNAc-ядро, связанное через амидный азот остатка Asn, который входит в последовательность -Asn-Xaa-Thr/Ser (где Xaa не является Pro). Для белка коагуляции С сообщалось о наличии дополнительного сайта гликозилирования -Asn-Xaa-Cys-. В некоторых случаях деградирующий гиалуронан фермент, такой как гиалуронидаза, может быть N- и O-гликозилирован. Например, PH20 имеет один O-связанный олигосахарид в положении T475 и шесть N-связанных олигосахаридов в положениях N82, N166, N235, N254, N368, N393 последовательности человеческой PH20, приведенной в SEQ ID NO: 107. Аминокислотные остатки N82, N166 и N254 заняты гликанами сложного типа, в то время как аминокислотные остатки N368 и N393 заняты богатыми маннозой гликанами (см., Пример 6 ниже). Аминокислотный остаток N235 приблизительно в 80% случаев занят богатыми маннозой гликанами, а в 20% случаев - сложными гликанами.

Хотя изменение типа гликана при модифицировании гликопротеина может драматически повлиять на антигенность белка, его структурный фолдинг, растворимость и стабильность, считается, что большинство ферментов не требуют гликозилирования для оптимальной ферментативной активности. Для некоторых гиалуронидаз удаление N-гликозилирования может привести к практически полной инактивации. Таким образом, для таких гиалуронидаз наличие N-гликанов необходимо для получения активного фермента. Наличие N-гликанов в полипептиде PH20 необходимо для получения активного фермента.

Например, авторами изобретения установлено, что полное дегликозилирование человеческого PH20 путем обработки эндогликозидазой ПНГазой F или ингибитором GlcNAc-фосфотрансферазы (GPT) туникамицином приводит к полной потере гиалуронидазной активности (см., Примеры 7-8 ниже). В отличие от этого, частичное дегликозилирование человеческой PH20 обработкой эндогликозидазой EndoF1, EndoF2, EndoF3 или EndoH не влияет на активность человеческой гиалуронидазы PH20 (см., Пример 7 ниже).

b. GPI-якорь.

Человеческий PH20 представляет собой белок с GPI-якорем. Таким образом, полипептид PH20 крепится к внеклеточной поверхности плазматической мембраны через гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь, прикрепленный к С-концу белка. Белки с GPI-якорем, такие как человеческий PH20, транслируются с отщепляемым N-концевым сигнальным пептидом, который направляет белок в эндоплазматический ретикулум (ЭР). На С-конце указанных белков присутствует другая сигнальная последовательность, которая направляет присоединение к полипептиду предварительно образованного GPI-якоря в просвете ЭР. Присоединение GPI-якоря происходит после расщепления С-концевой части полипептидной цепи по определенной аминокислотной позиции, называемой ω -сайтом (как правило, сайт расположен приблизительно в 20-30 аминокислотах от С-конца). Несмотря на то, что, как представляется, не существует консенсусной последовательности для идентификации расположения ω -сайта, белки с GPI-якорем содержат С-концевую сигнальную последовательность или домен присоединения GPI-якоря, который, как правило, содержит преимущественно гидрофобную область из 8-20 аминокислот, которой предшествует гидрофильный спейсерный район из 8-12 аминокислот, расположенный непосредственно после ω -сайта. Указанный гидрофильный спейсерный район часто богат заряженными аминокислотами и пролином (White и др., (2000) *J. Cell Sci.* 113 (часть 4): 721-727). Более детальный анализ показывает, что существует область приблизительно из 11 аминокислот, предшествующая ω -1 позиции, которая характеризуется низким уровнем предсказанной вторичной структуры, область вокруг сайта расщепления (ω -сайт) от ω -1 до ω +2, которая характеризуется наличием остатков с небольшими боковыми цепями, спейсерная область между позициями ω +3 и ω +9 и гидрофобный хвост от ω +10 до С-конца (Pierleoni и др., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392).

Хотя не существует консенсусной сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, было разработано множество различных *in silico* методов и алгоритмов, которые могут быть использованы для определения таких последовательностей в полипептидах (см., например, Udenfriend и др., (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber и др., (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 741-758; Kronegg и Buloz (1999), "Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI)," 129.194.185.165/dgpi/; Fankhauser и др., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria и др., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni и др., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392), включая методы, доступные на биоинформатических веб-сайтах, таких как вебсайт ExPASy Proteomics tools (вебсайт expasy.ch/tools/). Таким образом, специалист в данной области может определить, содержит ли полипептид PH20 сигнальную последовательность присоединения GPI-якоря, и, следовательно, является ли полипептид PH20 белком с GPI-якорем.

Сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря человеческого PH20 занимает позиции 491-509 в аминокислотной последовательности полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107, ω -сайт находится в положении 490. Таким образом, у человеческой PH20 после переноса в ЭР отщепляются аминокислоты 491-509, и GPI-якорь ковалентно присоединяется к остатку серина в положении 490. Ковалентное присоединение GPI-якоря к С-концу PH20 человека и, следовательно, мембраносвязанный характер PH20, были подтверждены с помощью исследований с фосфатидилинозитол-специфическим гидролизом фосфолипазой C (PI-PLC) (см., например, Lin и др., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:1157-1163 и Пример 3 ниже). Специфичные к фосфатидилинозитолу фосфолипазы C (PI-PLC) и D (PI-PLD) гидролизуют GPI-якорь, освобождая полипептид PH20 от клеточной мембраны. Следовательно, полученный освобожденный полипептид PH20 является растворимым. Растворимый PH20 может быть обнаружен и отделен от нерастворимого, мембраносвязанного PH20 хорошо известными в данной области методами, включая, но не ограничиваясь тестом с Тритон® X-114, как описано ниже и в Примере 4. В указанном анализе растворимая гиалуронидаза PH20 переходит в водную фазу нагретого до 37°C раствора Тритон® X-114 (Bordier и др., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7), тогда как заякоренная в мембране гиалуронидаза PH20 переходит в богатую детергентом фазу. Таким образом, для определения, является ли полипептид PH20 *in vivo* GPI-заякоренным, в дополнение к использованию алгоритмов также могут быть выполнены тесты на растворимость.

c. Длинные (длинные) растворимые полипептиды PH20 Изобретение включает длинные растворимые полипептиды PH20 (esPH20) и их композиции. Примерами предусмотренных в данном изобретении полипептидов esPH20 являются полипептиды esPH20 приматов, включая, но не ограничиваясь, полипептидами esPH20 человека и шимпанзе. Предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 являются растворимыми, т.е. секретируемыми, белками PH20, укороченными на С-конце, но сохраняющими, по меньшей мере, один или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря соответствующего полипептида PH20 дикого типа (например, укороченными по

положениям аминокислотной последовательности 491-500). Полипептиды esPH20 могут быть получены из любого GPI-заякоренного полипептида PH20 модификацией GPI-заякоренного полипептида PH20, то есть удалением части сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, при условии, что полученный полипептид esPH20 растворим. Растворимость или секрецию в культуральную среду можно определить с помощью SDS-PAGE и анализа методом Вестерн-блоттинг после экспрессии или, альтернативно, с помощью теста с Тритон® X-114, как описано ниже и в Примере 4, при этом полипептид PH20 получают любым способом, известным специалисту в данной области, в том числе рекомбинантной экспрессией и синтетически. Предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 могут быть использованы, например, в качестве терапевтических полипептидов, в качестве агентов для распространения или диспергирующих агентов в сочетании с другими препаратами, лекарствами и белками для улучшения их диспергирования и доставки, а также для улучшения фармакокинетического и фармакодинамического профиля совместно вводимых агентов, лекарственных средств или белков.

Предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, что обеспечивает растворимость полипептида esPH20, то есть полипептид переходит в водную фазу раствора Тритон® X-114, как описано ниже. Длинные растворимые полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть получены укорочением С-конца любого природного GPI-заякоренного полипептида PH20, где полученный полипептид esPH20 является растворимым и содержит 1 или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Специалист в данной области с применением хорошо известных в уровне техники методов легко может определить, является ли полипептид PH20 GPI-заякоренным. Такие методы включают, но не ограничиваются использованием известных алгоритмов для предсказания наличия и расположения сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря и ω -сайта, а также тестом на растворимость до и после фосфатидилинозитол-специфического расщепления фосфолипазой C (PI-PLC) или D (PI-PLD).

Примеры полипептидов esPH20 включают, но не ограничиваются полипептидами esPH20 приматов, такими как, например, полипептиды esPH20 человека и шимпанзе. Например, предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 могут быть получены усечением С-конца любого зрелого полипептида или полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 107, 108 или 197, а также усечением их аллельных или других вариантов, в том числе их активных фрагментов, при условии, что полученный полипептид растворим и сохраняет один или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Аллельные варианты и другие варианты известны специалистам в данной области и включают полипептиды с 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95% или большей идентичностью последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 107, 108 и 197. Полипептиды esPH20 по настоящему документу могут быть укорочены с С-конца на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот по сравнению с полипептидом дикого типа, таким как полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 107, 108 и 197, при условии, что полученный полипептид esPH20 растворим и сохраняет один или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря.

Длинные растворимые полипептиды PH20 по настоящему документу сохраняют гиалуронидазную активность. Кроме того, полипептиды esPH20 являются активными в нейтральной среде, то есть они сохраняют гиалуронидазную активность при нейтральном pH. Гиалуронидазная активность может быть увеличена или уменьшена по сравнению с GPI-заякоренной формой PH20 дикого типа. Например, предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 могут проявлять гиалуронидазную активность, которая составляет 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности, проявляемой GPI-заякоренной формой PH20 дикого типа.

1. Полипептиды esPH20 человека.

Примерами предусмотренных в данном изобретении полипептидов esPH20 являются человеческие полипептиды esPH20. Человеческие полипептиды esPH20 по настоящему документу растворимы и содержат 1 или более аминокислотных остатков из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Таким образом, в данном изобретении предусмотрены растворимые формы человеческой PH20, в которых не полностью отсутствует сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря.

Полипептиды-предшественники esPH20 человека по настоящему документу включают, но не ограничиваются полипептидами с укороченным С-концом с последовательностью, соответствующей последовательности от 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 аминокислоты из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 107. При экспрессии в клетках млекопитающих во время процессинга у белка отщепляется N-концевая сигнальная последовательность из 35 аминокислот, и секретируется зрелая форма белка. Таким образом, зрелые человеческие полипептиды esPH20 содержат аминокислоты от 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 из SEQ ID NO: 107. Таким образом, зрелые человеческие полипептиды esPH20 по настоящему документу включают полипептиды, приведенные в SEQ ID NO: 59-63 и 100-104, или их аллельные или другие варианты.

Предусмотренные в данном изобретении человеческие полипептиды esPH20 могут быть экспрессированы в клетках СНО или, альтернативно, могут быть получены в любых клетках или каким-либо способом, известным специалисту в данной области, при условии, что полипептиды растворимы и содержат, по меньшей мере, одну аминокислоту из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Получаемые в клетках СНО растворимые человеческие полипептиды esPH20 представляют собой полипептиды, секретируемые в культуральную среду. Специалисту в данной области очевидно, что если секретируемый esPH20 растворим, то есть переходит в водную фазу раствора Тритон® X-114, как описано ниже, то человеческий esPH20 может частично секретироваться, то есть экспрессированный полипептид может секретироваться в культуральную среду на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. Человеческие полипептиды esPH20 по настоящему документу, содержащие аминокислоты 1-500 или 36-500, частично секретируются. Кроме того, при экспрессии в клетках СНО полипептиды-предшественники человеческого esPH20, содержащие аминокислоты с 1 по 498, 499 или 500, или зрелые человеческие полипептиды esPH20, содержащие аминокислоты с 36 до 498, 499 или 500, экспрессируются слабо (см., Пример 3 ниже).

Таким образом, примеры полипептидов-предшественников человеческой esPH20 включают, но не ограничиваются любыми укороченными с С-конца полипептидами с последовательностью от 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496 или 497 аминокислоты из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 107. При экспрессии в клетках млекопитающих после отщепления у белка во время процессинга N-концевой сигнальной последовательности, зрелые человеческие полипептиды esPH20 содержат аминокислотные последовательности, соответствующие аминокислотам от 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496 или 497 из SEQ ID NO: 107. Таким образом, примеры зрелых человеческих полипептидов esPH20 по настоящему документу включают полипептиды, содержащие 456, 457, 458, 459, 460, 461 или 462 аминокислот в длину, такие как полипептиды в любой из SEQ ID NO: 60-63 и 102-104, или их аллельные или иные варианты. Аллельные варианты и другие варианты, как известно специалистам в данной области, включают полипептиды с 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 107 или 108.

Также в данном изобретении предусмотрены человеческие полипептиды esPH20 с аминокислотными заменами. Полипептиды esPH20 с аминокислотными заменами представляют собой человеческие полипептиды esPH20, модифицированные аминокислотными заменами по сравнению с человеческими полипептидами esPH20, предусмотренными в данном изобретении и приведенными, например, в SEQ ID NO: 60-63 и 102-104. Таким образом, человеческие полипептиды esPH20 с аминокислотными заменами представляют собой укороченные с С-конца полипептиды. В некоторых примерах последовательности человеческих полипептидов esPH20 с аминокислотными заменами по настоящему документу по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичны аминокислотным последовательностям с 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496 или 497 аминокислоты или последовательностям с 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496 или 497 аминокислоты из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107. В других примерах последовательности человеческих полипептидов esPH20 с аминокислотными заменами на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичны последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 60-63 и 102-104.

Предусмотренные в данном изобретении человеческие полипептиды esPH20 могут проявлять увеличенную или уменьшенную по сравнению с PH20 с GPI-якорем дикого типа гиалуронидазную активность. Например, предусмотренные в данном изобретении человеческие полипептиды esPH20 могут проявлять гиалуронидазную активность, которая составляет 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности формы дикого типа с GPI-якорем. В некоторых примерах человеческие полипептиды esPH20 обладают повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с формой дикого типа с GPI-якорем. Гиалуронидазная активность человеческих полипептидов esPH20 может быть увеличена на 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% и более по сравнению с гиалуронидазной активностью формы дикого типа с GPI-якорем.

Предусмотренные в данном изобретении человеческие полипептиды esPH20 проявляют гиалуронидазную активность в нейтральной среде или гиалуронидазную активность, измеряемую при нейтральном pH, увеличенную или уменьшенную по сравнению с PH20 с GPI-якорем дикого типа. Например, предусмотренные в данном изобретении человеческие полипептиды esPH20 могут проявлять гиалуронидазную активность, которая составляет 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности формы дикого типа с GPI-якорем. В некоторых примерах человеческие полипептиды esPH20 обладают пониженной гиалуронидазной активностью в нейтральной среде по сравнению с формой дикого типа с GPI-якорем. Гиалуронидазная активность в нейтральной среде может быть снижена на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% и более по сравнению с гиалуронидазной активностью формы дикого типа с GPI-якорем в нейтральной среде. В других примерах человеческие полипептиды esPH20 обладают повышенной гиалуронидазной активностью в нейтральной среде по сравнению с формой дикого типа с GPI-якорем. Гиалуронидазная активность в нейтральной среде может быть увеличена на 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% и более по сравнению с гиалуронидазной активностью формы дикого типа с GPI-якорем в нейтральной среде.

Как правило, для сохранения активности полипептида человеческие полипептиды esPH20 получают с помощью систем экспрессии белков, которые обеспечивают правильное N-гликозилирование, так как гликозилирование является важным для каталитической активности и стабильности этих полипептидов. Примеры полезных для рекомбинантной экспрессии полипептидов esPH20 клеток включают, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, клетки DG44 CHO или клетки CHO-S).

2. Полипептиды esPH20 других видов.

Изобретение включает длинные растворимые полипептиды PH20 не человеческого происхождения. Для определения позиций, соответствующих позициям 491-500 человеческого полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 107, специалист в данной области техники может произвести выравнивание аминокислотной последовательности человеческого PH20 с последовательностью любого полипептида PH20 не человеческого происхождения, у которого для получения длинного растворимого полипептида PH20 может быть укорочен С-конец. Кроме того, для прогнозирования расположения в полипептиде сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря могут быть использованы, например, описанные в данном изобретении алгоритмы. Чтобы определить, являются ли полученные укороченные с С-конца полипептиды растворимыми, и, следовательно, представляют ли собой полипептиды esPH20, с помощью хорошо известных в уровне техники методов, включая анализы с Тритон® X-114, описанные ниже и в Примере 4, можно оценить растворимость укороченных с С-конца полипептидов.

Изобретение включает длинные растворимые полипептиды PH20 приматов, где приматы не включают человека. Примеры полипептидов PH20 с GPI-якорем приматов включают, но не ограничиваются, PH20 шимпанзе (SEQ ID NO: 197). Таким образом, в данном изобретении предусмотрены полипептиды esPH20 шимпанзе.

Предусмотренные в данном изобретении полипептиды esPH20 шимпанзе укорочены с С-конца, как описано выше для укороченных с С-конца человеческих полипептидов esPH20. Таким образом, аминокислотные последовательности предусмотренных в данном изобретении полипептидов esPH20 шимпанзе соответствуют аминокислотным остаткам с 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 или 501 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107.

Полипептиды PH20 шимпанзе могут быть выровнены с человеческими полипептидами PH20 любым способом, известным специалисту в данной области. При выравнивании обычно достигается максимальное число совпадений, и способы выравнивания включают ручное выравнивание, выравнивание с помощью многочисленных доступных программ (например, BLASTP) и другие известные специалистам в данной области способы. На фиг. 1 представлен результат выравнивания полипептидов-предшественников PH20 человека и шимпанзе. Аминокислотные остатки с 491 до 500 человеческой PH20 (где человеческие полипептиды esPH20 по настоящему документу укорочены по сравнению с человеческим полипептидом PH20 дикого типа) соответствуют аминокислотным остаткам с 491 до 501 PH20 шимпанзе. Таким образом, в данном изобретении предусмотрены полипептиды esPH20 шимпанзе, содержащие аминокислотные остатки с 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 или 501 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 197. При экспрессии в системах экспрессии млекопитающих во время процессинга отщепляется сигнальный пептид из 35 аминокислот, и секретируется зрелая форма белка. Таким образом, зрелые полипептиды esPH20 шимпанзе содержат аминокислоты с 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 или 501 из SEQ ID NO: 197.

Примеры полипептидов esPH20 шимпанзе включают полипептиды, которые содержат аминокислотные остатки с 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 или 498 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 197. При экспрессии в системах экспрессии млекопитающих во время процессинга отщепляется сигнальный пептид из 35 аминокислот, и секретируется зрелая форма белка. Таким образом, зрелые полипептиды esPH20 шимпанзе содержат аминокислоты с 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497 или 498 из SEQ ID NO: 197.

D. Частично N-гликозилированные полипептиды PH20.

Изобретение включает частично N-гликозилированные гиалуронидазы, в том числе частично дегликозилированные полипептиды PH20, которые полностью или частично сохраняют гиалуронидазную активность N-гликозилированной гиалуронидазы. Примеры частично дегликозилированных гиалуронидаз включают частично дегликозилированные полипептиды PH20 любых видов, например, полипептиды, приведенные в любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198, или их аллельные или другие варианты. Аллельные и другие варианты, как известно специалистам в данной области техники, включают полипептиды, обладающие 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198 или их усеченными формами. Частично дегликозилированные гиалуронидазы по настоящему документу также включают гибридные, слитые и химерные частично дегликозилированные гиалуронидазы и конъюгаты частично дегликозилированных гиалуронидаз.

Предусмотренные в данном изобретении частично N-гликозилированные гиалуронидазы могут быть получены с помощью расщепления одной или несколькими гликозидазами. Таким образом, хотя

все сайты N-гликозилирования (например, сайты в аминокислотных позициях N82, N166, N235, N254, N368 и N393 PH20 человека, приведенной, например, в SEQ ID NO: 107) могут быть гликозилированы, степень гликозилирования белка будет уменьшена по сравнению с гиалуронидазой, не расщепленной одной или несколькими гликозидазами. Частично дегликозилированные гиалуронидазы по настоящему документу, в том числе частично дегликозилированные растворимые полипептиды PH20, могут обладать 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазой. В одном из примеров 1, 2, 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, частично дегликозилированы, так что они больше не содержат богатых маннозой или сложных гликанов, а содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовые фрагменты. В некоторых примерах 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166 и N254 из SEQ ID NO: 107, дегликозилированы, то есть не содержат полисахаридного фрагмента. В других примерах 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, гликозилированы. Гликозилированные аминокислотные остатки содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент.

Также в данном изобретении предусмотрены частично N-гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20. У частично дегликозилированных укороченных с С-конца полипептидов PH20 по настоящему документу отсутствуют одна или несколько аминокислот из С-конца полноразмерного полипептида PH20, такого как любой из полипептидов, приведенных в SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198. Таким образом, частично N-гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть укорочены с С-конца на 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 или более аминокислот по сравнению с полноразмерным полипептидом дикого типа, например, полноразмерным полипептидом дикого типа с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198. В некоторых примерах в белке гликозилированы 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. Гликозилированные аминокислотные остатки содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент. В других примерах 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующие аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, не гликозилированы. В других примерах может быть уменьшена степень гликозилирования, так что частично гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 не содержат богатых маннозой и сложных гликанов, но содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент, сохраняя при этом гиалуронидазную активность. Таким образом, частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть гликозилированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированного укороченного с С-конца полипептида PH20.

Частично дегликозилированные полипептиды PH20 и укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу сохраняют гиалуронидазную активность. Кроме того, частично дегликозилированные полипептиды PH20 и укороченные с С-конца полипептиды PH20 активны в нейтральной среде, то есть они сохраняют гиалуронидазную активность при нейтральном pH. Гиалуронидазная активность может быть увеличена или уменьшена по сравнению с гликозилированными полноразмерными или укороченными с С-конца полипептидами PH20. Например, частично дегликозилированные полипептиды PH20 и укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут проявлять гиалуронидазную активность, которая составляет 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности гликозилированных полноразмерных и укороченных с С-конца полипептидов PH20.

Таким образом, предусмотренные в данном изобретении полипептиды PH20 могут быть использованы в качестве терапевтических полипептидов, например, для лечения связанных с гиалуроновой кислотой заболеваний или состояний. Частично дегликозилированные полипептиды PH20 и укороченные с С-конца полипептиды PH20 также могут быть использованы, например, для комбинированной терапии.

1. Полипептиды PH20.

Примеры частично N-гликозилированных гиалуронидаз по настоящему документу включают частично дегликозилированные полипептиды PH20 любых видов, например, частично дегликозилированные полипептиды, приведенные в любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198, или их аллельные или другие варианты. Аллельные и другие варианты, как известно специалистам в данной области техники, включают полипептиды, обладающие 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95% или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198 или их усеченными формами. В некоторых примерах в полипептидах гликозилированы 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В других примерах 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166 и N254 из SEQ ID NO: 107, не гликозилированы. В некоторых примерах 1, 2, 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент.

Частично дегликозилированные гиалуронидазы по настоящему документу могут быть получены расщеплением одной или несколькими гликозидазами. Таким образом, хотя все сайты N-гликозилирования (например, сайты гликозилирования, соответствующие аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 человеческой PH20, приведенной в SEQ ID NO: 107) могут быть гликозилированы, степень их гликозилирования уменьшается по сравнению с не расщепленной одной или несколькими гликозидазами гиалуронидазой. В частности, частично гликозилированные гиалуронидазы сохраняют в каждом сайте N-гликозилирования, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент. Частично гликозилированные гиалуронидазы могут быть гликозилированы по 3, 4, 5, или 6 сайтам N-гликозилирования, соответствующим аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В некоторых примерах гиалуронидазы дегликозилированы по 1, 2 или 3 сайтам N-гликозилирования, соответствующим аминокислотным остаткам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. Частично дегликозилированные полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть гликозилированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазой.

Гликозидазы или гликозидгидролазы представляют собой ферменты, которые катализируют гидролиз гликозидной связи с образованием двух меньших молекул углеводов. Как показано на фиг. 2, к основным видам N-гликанов у позвоночных животных можно отнести богатые маннозой гликаны, гибридные гликаны и сложные гликаны. Существует несколько гликозидаз, которые дегликозилируют белки только частично, например, EndoF1, которая расщепляет богатые маннозой и гибридные гликаны; EndoF2, которая расщепляет биантенные сложные гликаны; EndoF3, которая расщепляет биантенные и более разветвленные сложные гликаны, и EndoH, которая расщепляет богатые маннозой и гибридные гликаны (фиг. 3). Обработка гиалуронидазы, такой как растворимая гиалуронидаза, такая как растворимая PH20, одной или всеми указанными гликозидазами может привести лишь к частичному дегликозилированию и, следовательно, сохранению гиалуронидазной активности.

Например, обработка gHuPH20 одной или всеми описанными выше гликозидазами приводит к частичному дегликозилированию. Частично дегликозилированные полипептиды gHuPH20 могут проявлять гиалуронидазную активность, которая сопоставима с активностью полностью гликозилированного полипептида (см. Пример 7). Напротив, обработка gHuPH20 (SEQ ID NO: 122) ПНГазой F, гликозидазой, которая расщепляет все N-гликаны (см. фиг. 3), или обработка ингибитором GlcNAc-фосфотрансферазы (GPT) туникамицином приводит к полному удалению всех N-гликанов и, тем самым, делает PH20 энзиматически неактивной (см. Примеры 7-8 ниже).

Частично дегликозилированная гиалуронидаза по настоящему документу, в том числе частично дегликозилированный растворимый полипептид PH20, может сохранить 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования

полностью гликозилированного полипептида. Как правило, частично дегликозилированная гиалуронидаза, в том числе частично дегликозилированный растворимый полипептид PH20, проявляет гиалуронидазную активность, которая составляет 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности полностью гликозилированного полипептида.

Частично дегликозилированные гиалуронидазы по настоящему документу также включают гибридные, слитые и химерные частично дегликозилированные гиалуронидазы и конъюгаты частично дегликозилированных гиалуронидаз.

2. Укороченные с С-конца полипептиды PH20.

Примеры частично N-гликозилированных или частично дегликозилированных полипептидов PH20 по настоящему документу включают укороченные с С-конца полипептиды PH20. В последовательности частично гликозилированных укороченных с С-конца полипептидов PH20 по настоящему документу отсутствуют один или несколько аминокислотных остатков из С-конца полноразмерного полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198. Таким образом, частично гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть укорочены с С-конца на 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 или более аминокислот по сравнению с полноразмерным полипептидом дикого типа, например, полноразмерным полипептидом дикого типа с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198. В некоторых примерах в полипептиде гликозилированы 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В других примерах 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166 и N254 из SEQ ID NO: 107, не гликозилированы.

Частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть получены расщеплением одной или несколькими гликозидазами. Хотя все сайты N-гликозилирования (например, сайты гликозилирования, соответствующие аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 человеческой PH20, приведенной в SEQ ID NO: 107) могут быть гликозилированы, степень их гликозилирования уменьшается по сравнению с не расщепленной одной или несколькими гликозидазами гиалуронидазой. Таким образом, частично дегликозилированные полипептиды

PH20 по настоящему документу могут быть гликозилированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазы. В частности, частично N-гликозилированные гиалуронидазы сохраняют в каждом сайте N-гликозилирования, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент. В некоторых примерах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент. В других примерах 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, гликозилированы, и уровень гликозилирования в каждом из 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования соответствует полностью гликозилированной гиалуронидазе. В дополнительных примерах 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, полностью дегликозилированы. В этих примерах, как правило, полностью дегликозилированы аминокислоты N82, N166 и N254.

Примеры частично N-гликозилированных укороченных с С-конца полипептидов PH20 включают полипептиды любого видового происхождения, например, любые полипептиды, приведенные в SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198, или их аллельные и другие варианты. Аллельные и другие варианты, как известно специалистам в данной области техники, включают полипептиды, обладающие 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или большей идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198 или их усеченными формами. Частично N-гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу также включают гибридные, слитые и химерные полипептиды PH20 и конъюгаты PH20. Например, частично дегликозилированный укороченный с С-конца полипептид PH20 по настоящему документу может быть конъюгирован с полимером, таким как декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) (т.е. пегилирован), фрагмент полимера сиаловой кислоты или другие подобные полимеры, например, природные полимеры и полисахариды. В других примерах частично N-гликозилированный укороченный с С-конца полипептид PH20 связан или слит с белковым доменом, таких как домен Fc иммуноглобулина IgG.

Гликозилированные или частично гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды по настоящему документу включают полипептиды, укороченные с С-конца на 2 - 44 аминокислоты по сравнению с PH20 дикого типа, приведенным в SEQ ID NO: 107 (полипептид-предшественник) или 108 (зрелый полипептид), а также их аллельные или видовые варианты. Таким образом, укороченные с С-конца полипептиды PH20 включают любые полипептиды с усеченным С-концом, последовательности которых соответствуют последовательности с 1 аминокислоты до 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, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 или 507 аминокислоты из SEQ ID NO: 107, или соответствующим позициям в ее аллельных или видовых вариантах, причем в указанных полипептидах 2, 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, должны быть гликозилированы. При экспрессии в клетках млекопитающих во время процессинга у белка отщепляется N-концевая сигнальная последовательность из 35 аминокислот, и секретируется зрелая форма белка. Таким образом, в данном изобретении предусмотрены зрелые человеческие укороченные с С-конца полипептиды PH20, последовательности которых соответствуют аминокислотам с 36 до 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, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506 или 507 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107, или соответствующим аминокислотам в ее аллельных или видовых вариантах, причем в указанных полипептидах 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, должны быть гликозилированы.

В табл. 2 приведены не ограничивающие примеры укороченных с С-конца полипептидов PH20, которые могут быть гликозилированы или частично дегликозилированы. В табл. 2 ниже приведена длина (в аминокислотах) полипептидов-предшественников и зрелых полипептидов, а также идентификаторы последовательностей (SEQ ID NO), под которыми приведены примеры аминокислотных последовательностей укороченных с С-конца полипептидов-предшественников и зрелых полипептидов PH20. Полипептид PH20 дикого типа также включен в табл. 2 для сравнения.

Таблица 2. Примеры укороченных с С-конца полипептидов PH20

Полипептид	Предшественник (аминокислот)	Предшественник SEQ ID NO	Зрелый пептид (аминокислот)	Зрелый пептид SEQ ID NO
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
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-ADVК	450	43	415	95

N-гликозилированные и частично дегликозилированные усеченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу включают растворимые полипептиды, то есть полипептиды, которые переходят в водную фазу раствора Тритон® X-114, и нерастворимые полипептиды, то есть полипептиды, которые переходят в богатую детергентом фазу раствора Тритон® X-114. Частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть гликозилированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазы. Кроме того, частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 могут

иметь 1, 2 или 3 сайта N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166 и N254 из SEQ ID NO: 107, которые не гликозилированы. Сайт N-гликозилирования, содержащий, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминный фрагмент, считается гликозилированным.

В некоторых примерах частично N-гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды по настоящему изобретению являются растворимыми, т. е. не содержат GPI-якорь. Наличие GPI-якоря можно установить, например, с помощью анализа с Тритон® X-114 после инкубации с PI-PLC или PI-PLD, как описано ниже и в Примере 4. Например, полипептиды PH20, укороченные с С-конца к 5' концу от аминокислоты, соответствующей аминокислотной позиции 490 полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 107, при получении в системе экспрессии млекопитающих обычно растворимы (см. Пример 3). Эти полипептиды растворимы в силу того, что они полностью лишены сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. В других примерах частично гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды по настоящему изобретению при получении в системе экспрессии млекопитающих являются нерастворимыми и связанными с мембраной. Например, полипептиды PH20, укороченные с С-конца к 3' концу от аминокислоты, соответствующей аминокислотной позиции 500 полипептида PH20, приведенного в SEQ ID NO: 107, при получении в системе экспрессии млекопитающих обычно нерастворимы (см. Пример 3). Укороченные с С-конца полипептиды по настоящему документу могут быть частично гликозилированы, то есть в полипептидах 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, являются гликозилированными.

Растворимые частично гликозилированные усеченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу включают полипептиды, которые являются укороченными, но сохраняют, по меньшей мере, один или более аминокислотных остатков, расположенных в сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, и полипептиды, в которых полностью отсутствует сигнальная последовательность присоединения GPI-якоря и ω-сайт. Таким образом, указанные полипептиды лишены ковалентно присоединяемого в ЭР к С-концу белка GPI-якоря, не связаны с внеклеточной поверхностью плазматической мембраны и являются секретируемыми. Указанные усеченные с С-конца полипептиды PH20 могут быть частично гликозилированы, например, могут быть гликозилированы 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования. Примеры растворимых укороченных с С-конца полипептидов PH20 без сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря включают полипептиды любых видов, например, приведенные в любой из SEQ ID NO: 107-109, 111-120, 197 и 198 полипептиды, или их аллельные или другие варианты. Последовательности указанных растворимых частично гликозилированных усеченных с С-конца полипептидов PH20 соответствуют аминокислотам с 1 до 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 или 500 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107. После отщепления N-концевой сигнальной последовательности при экспрессии в клетках млекопитающих последовательности зрелых растворимых частично гликозилированных усеченных с С-конца полипептидов PH20 соответствуют

аминокислотам с 36 до 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 или 500 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107. В некоторых примерах растворимые полипептиды PH20 с усеченной с С-конца сигнальной последовательностью присоединения GPI-якоря частично гликозилированы и содержат, например, по меньшей мере, остаток N-ацетилглюкозамина в 3, 4, 5 или 6 сайтах N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В других примерах растворимые полипептиды PH20 с усеченной с С-конца сигнальной последовательностью присоединения GPI-якоря гликозилированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазы.

Частично дегликозилированные усеченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу, которые сохраняют, по меньшей мере, одну аминокислоту из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, представляют собой частично дегликозилированные длинные растворимые полипептиды PH20. В некоторых примерах частично дегликозилированные усеченные с С-конца полипептиды PH20 не гликозилированы по 1, 2 или 3 сайтам N-гликозилирования, соответствующим аминокислотам N82, N166 и N254 из SEQ ID NO: 107. Указанные частично дегликозилированные длинные растворимые полипептиды PH20 включают аминокислоты с 1 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107. При экспрессии в клетках млекопитающих во время процессинга отщепляется N-концевая сигнальная последовательность из 35 аминокислот, и секретируется зрелая форма белка. Таким образом, зрелая форма частично дегликозилированного полипептида esPH20 включает аминокислоты с 36 до 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 107. Зрелые человеческие частично гликозилированные полипептиды esPH20 по настоящему документу включают приведенные в SEQ ID NO: 59-63 и 100-104 полипептиды, содержащие, по меньшей мере, остатки N-ацетилглюкозамина в 3, 4, 5 или 6 сайтах N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235,

N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В некоторых примерах степень гликозилирования уменьшают обработкой эндогликозидазой. Таким образом, частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу, содержащие, по меньшей мере, одну аминокислоту из сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря, могут быть гликозированы на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазы.

Также в данном изобретении предусмотрены частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20, которые не растворимы, то есть прикреплены к клеточной мембране и поэтому не секретируются в культуральную среду при экспрессии. Не растворимые усеченные с С-конца полипептиды PH20 могут быть частично дегликозилированы, при условии, что они сохраняют гиалуронидазную активность. Примеры частично гликозилированных зрелых укороченных с С-конца полипептидов PH20, которые не являются растворимыми, включают полипептиды с последовательностями, соответствующими аминокислотам с 36 до 501, 502, 503, 504, 505, 506 или 507 из SEQ ID NO: 107. Таким образом, частично гликозилированные укороченные с С-конца нерастворимые полипептиды PH20 по настоящему документу включают полипептиды длиной 466, 467, 468, 469, 470, 471 или 472 аминокислот, например, приведенные в SEQ ID NO: 55-58 и 97-99, которые сохраняют, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80% от уровня гликозилирования полностью гликозилированной гиалуронидазы. В некоторых примерах в полипептидах гликозилированы 3, 4, 5, или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107. В других примерах 1, 2, 3, 4, 5 или 6 сайтов N-гликозилирования, соответствующих аминокислотам N82, N166, N235, N254, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107, содержат, по меньшей мере, N-ацетилглюкозаминовый фрагмент.

Частично гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды по настоящему документу могут проявлять увеличенную или уменьшенную по сравнению с формой PH20 с GPI-якорем дикого типа гиалуронидазную активность. Кроме того, частично дегликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20 активны в нейтральной среде, то есть они сохраняют гиалуронидазную активность при нейтральном pH. Например, усеченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут проявлять гиалуронидазную активность, которая составляет 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500, 1000% и более от гиалуронидазной активности, проявляемой формой дикого типа с GPI-якорем. В некоторых примерах частично гликозилированные усеченные с С-конца полипептиды PH20 обладают повышенной гиалуронидазной активностью по сравнению с формой дикого типа с GPI-якорем.

Усеченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть также N-гликозилированы. N-гликозилированные и частично N-гликозилированные гиалуронидазы по настоящему документу также включают гибридные, слитые и химерные N-гликозилированные и частично дегликозилированные гиалуронидазы, а также конъюгаты N-гликозилированных и частично дегликозилированных гиалуронидаз.

3. Дополнительные модификации.

Предусмотренные в данном изобретении полипептиды PH20, в том числе человеческие полипептиды esPH20, N-гликозилированные и частично N-гликозилированные укороченные с С-конца полипептиды PH20, а также частично гликозилированные полипептиды PH20, включают также полипептиды, которые содержат химические или посттрансляционные модификации, и полипептиды, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются пегилированием, сиалированием, альбуминированием, гликозилированием, фарнезилированием, карбоксилированием, гидроксильрованием, фосфорилированием, а также другими известными в уровне техники модификациями полипептидов. Таким образом, предусмотренные в данном изобретении укороченные с С-конца полипептиды PH20, в том числе полипептиды esPH20, могут содержать и другие модификации, затрагивающие или не затрагивающие первичную последовательность полипептида, включая, но не ограничиваясь присоединением углеводного фрагмента, фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ), сиалильного фрагмента, Fc домена иммуноглобулина G или любого другого домена или фрагмента. Например, такие дополнительные модификации могут быть введены для повышения стабильности или времени полураспада белка в сыворотке. Укороченные с С-конца полипептиды PH20, в том числе полипептиды esPH20 по настоящему документу, могут быть конъюгированы или слиты с любым фрагментом с использованием любых методов, известных в уровне техники, в том числе химических и рекомбинантных методов.

Снижение иммуногенности.

У полипептидов PH20 по настоящему документу, включая человеческие полипептиды esPH20, может быть уменьшена иммуногенность. Снижение иммуногенности может быть достигнуто за счет внесения изменений в последовательность, которые устраняют антигенные эпитопы полипептида, или с помощью посттрансляционных модификаций. Например, предусмотрено изменение гликозилирования пептида, при условии, что полипептид должен содержать, по меньшей мере, остатки N-ацетилглюкозамина в аминокислотных позициях N235, N368 и N393 из SEQ ID NO: 107.

Например, полипептиды PH20 могут быть модифицированы таким образом, чтобы не содержать фукозу, особенно избежать бифукозилирования. В частности, предусмотренные в данном изобретении

полипептиды RN20 не бифукозилированы. Это может быть достигнуто путем экспрессии и получения полипептидов RN20 в клетках-хозяевах, как правило, клетках насекомых, в которых не происходит бифукозилирование. Фукоза представляет собой дезоксигексозу, которая присутствует в самых разнообразных организмах, включая млекопитающих, насекомых и растения. Фукозилированные гликаны синтезируются фукозилтрансферазами. См., например, Ма и др., *Glycobiology*, 15(2):158R-184R, (2006); Nakayama и др., *J. Biol. Chem.*, 276:16100-16106 (2001); и Sturla и др., *Glycobiology*, 15(10):924-935 (2005). У человека фукоза часто присутствует на концах модифицированных гликанов, было показано, что наличие связанной α 1,6-гликозидной связью с N-ацетилглюкозамином фукозы важно для процессинга и распознавания гликопротеинов. У насекомых в ядре структур N-гликанов встречается бифукозилирование с α 1,6- и α 1,3-связями. Фукозилирование ядра гликанов в клетках насекомых с α 1,3-связями порождает углеводные эпитопы, иммуногенные для человека (см., например, Заявка США № 20070067855). Например, полипептиды RN20 по настоящему документу, в том числе полипептиды esRN20, могут быть получены в клетках-хозяевах, которые не способны к бифукозилированию полипептида. Таким образом, хотя для экспрессии полипептидов могут быть использованы способные к бифукозилированию клетки насекомых или другие клетки, как правило, для получения полипептидов используют клетки млекопитающих, такие как клетки CHO.

В некоторых примерах в клетках насекомых с измененными путями гликозилирования могут быть получены дефукозилированные или фукоза-дефицитные полипептиды RN20, "маммалинизированные" клеточные системы экспрессии насекомых могут быть получены за счет применения бакуловирусных векторов экспрессии, содержащих гены процессинга олигосахаридов эукариот (см., например, Патент США № 6461863). Кроме того, антигенность может быть устранена при экспрессии полипептидов RN20 в клетках насекомых без α 1,3-фукозилтрансферазы (FT3) (см., например, Заявку США № 20070067855). В других примерах дефукозилированные или фукоза-дефицитные полипептиды RN20 могут быть получены, например, в клеточных линиях, которые производят дефукозилированные белки, в том числе в дефицитных по фукозилированию белков Lec13 CHO клетках (Ripka и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка США № 2003/0157108, а также WO 2004/056312), и нокаутных клеточных линиях, таких как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (Yamane-Ohnuki и др., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)).

Конъюгирование с полимерами.

В некоторых примерах полипептиды esRN20 и другие укороченные с С-конца полипептиды RN20, в том числе частично гликозилированные полипептиды RN20, предусмотренные в данном изобретении, конъюгированы с полимерами. Примеры полимеров, с которыми могут быть конъюгированы полипептиды RN20, включают природные и синтетические гомополимеры, такие как полиолы (т.е. поли-ОН), полиамины (то есть поли-NH₂) и поликарбоновые кислоты (например, поли-СООН), а также гетерополимеры, то есть полимеры, содержащие одну или несколько различных связывающихся групп, например, гидроксильные группы и аминогруппы. Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из полиалкиленоксидов (ПАО), таких как полиалкиленгликоли (ПАГ), включая полиэтиленгликоли (ПЭГ), метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ) и полипропиленгликоли, ПЭГ-глицидиловые эфиры (Ерох-ПЭГ), ПЭГ-оксикарбонилимидазол (CDI-ПЭГ), разветвленные полиэтиленгликоли (ПЭГ), поливиниловых спиртов (ПВС), поликарбоксилатов, поливинилпирролидона, поли-D,L-аминокислот, полиэтилен-ко-малеинового ангидрида, полистирол-ко-малеинового ангидрида, декстранов, в том числе карбоксиметилдекстранов, гепарина, гомологичных альбуминов, целлюлозы, в том числе метилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, карбоксиэтилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы, гидролизатов хитозана, крахмалов, таких как гидроксипропилкрахмал и гидроксипропилкрахмал, гликогена, агароз и их производных, гуаровой камеди, пуллулана, инулина, ксантановой камеди, каррагинана, пектина, гидролизатов альгиновой кислоты и биополимеров.

Как правило, полимеры представляют собой полиалкиленоксиды (ПАО), такие как полиэтиленоксиды, такие как ПЭГ, как правило, мПЭГ, которые по сравнению с полисахаридами, такими как декстран, пуллулан и тому подобное, включают меньше реактивных групп, способных к сшиванию. Как правило, полимеры представляют собой нетоксичные полимерные молекулы, такие как метоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ), которые могут быть ковалентно конъюгированы с полипептидами esRN20 и другими укороченными с С-конца полипептидами RN20 (например, к группам на поверхности белка) с использованием относительно простых химических методов.

Подходящие для присоединения к полипептидам esRN20 и другим укороченным с С-конца полипептидам RN20 полимерные молекулы включают, но не ограничиваются полиэтиленгликолем (ПЭГ) и производными ПЭГ, такими как метоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ), ПЭГ-глицидиловые эфиры (Ерох-ПЭГ), ПЭГ-оксикарбонилимидазол (CDI-ПЭГ), разветвленные ПЭГ и полиэтиленоксид (ПЭО) (см., например, Roberts и др., *Advanced Drug Delivery Review* 2002, 54: 459-476; Harris и Zalipsky "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar и др., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1): 125-136, 2000; Harris и Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; Tsubery, J

Biol. Chem 279(37): 38118-24, 2004). Молекулярная масса полимерных молекул обычно лежит в пределах приблизительно от 3 кДа до 60 кДа. В некоторых вариантах полимерные молекулы, конъюгированные с полипептидом PH20 по настоящему документу, имеют молекулярную массу 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более 60 кДа.

В уровне техники известны различные методы модификации полипептидов ковалентным присоединением (конъюгированием) ПЭГ или производных ПЭГ (т.е. "пегирования") (см., например, U.S. 2006/0104968; U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505 и U.S. 2004/0235734). Методы пегирования включают, но не ограничиваются использованием специализированных линкеров и конъюгирующих химических методов (см., например, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476, 2002), присоединением нескольких фрагментов ПЭГ к одному сайту конъюгирования (например, через использование разветвленных ПЭГ; см., например, Veronese и др., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-специфическим пегированием и/или монопегированием (см., например, Chapman и др., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999) и сайт-направленным ферментативным пегированием (см., например, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (см. также, например, Lu и Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu и Felix (1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix и др., (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar и др., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu и др., (1995) *J. Immunol.* 154:3088-95; см. также, Caliceti и др., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (10):1261-77 и Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 часть 2): 3-8). По методам и методикам, описанным в уровне техники, можно получать белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 ПЭГ или производных ПЭГ, присоединенных к одной молекуле белка (см., например, U.S. 2006/0104968).

В уровне техники описаны многочисленные реагенты для пегирования. Такие реагенты включают, но не ограничиваются N-гидроксисукцинимидил(NHS)-активированным ПЭГ, сукцинимидил-мПЭГ, мПЭГ₂-N-гидроксисукцинимидом, мПЭГ-сукцинимидил-альфа-метилбутаноатом, мПЭГ-сукцинимидилпропионатом, мПЭГ-сукцинимидилбутаноатом, сукцинимидиловым эфиром мПЭГ-карбоксиметил-3-гидроксипропановой кислоты, гомобифункциональным ПЭГ-сукцинимидилпропионатом, гомобифункциональным ПЭГ-пропиональдегидом, гомобифункциональным ПЭГ-бутиральдегидом, ПЭГ-малеимидом, ПЭГ-гидразидом, ПЭГ-п-нитрофенилкарбонатом, мПЭГ-бензотриазолкарбонатом, ПЭГ-пропиональдегидом, мПЭГ-бутиральдегидом, разветвленным мПЭГ₂-бутиральдегидом, мПЭГ-ацетилдом, мПЭГ-пиперидином, мПЭГ-метилкетондом, безлинкерным мПЭГ-малеимидом, мПЭГ-винилсульфоном, мПЭГ-тиолом, мПЭГ-ортопиридилтиоэфиром, мПЭГ-ортопиридилдисульфидом, Fmoc-ПЭГ-NHS, Boc-ПЭГ-NHS, ПЭГ-NHS-винилсульфоном, ПЭГ-NHS-акрилатом, ПЭГ-NHS-флуоресцеином, и ПЭГ-NHS-биотином (см., например, Monfardini и др., *Bioconjugate Chem* 6:62-69, 1995; Veronese и др., *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; U.S. 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; и WO 0187925).

Другие модификации.

Полипептиды esPH20 и другие укороченные с С-конца полипептиды PH20 по настоящему документу также включают их конъюгаты и слитые полипептиды.

Е. Способы получения нуклеиновых кислот, кодирующих длинные растворимые PH20 и другие растворимые гиалуронидазы PH20, и их полипептидов.

Длинные растворимые полипептиды PH20, усеченные с С-конца гиалуронидазы PH20 и частично гликозилированные гиалуронидазы PH20 по настоящему документу, а также молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие такие полипептиды, могут быть получены хорошо известными в уровне техники методами рекомбинантной экспрессии и очистки белков. Например, ДНК может быть получена из клонированной ДНК (например, из библиотеки ДНК), путем химического синтеза, клонированием кДНК, клонированием геномной ДНК или ее фрагментов, очищенных из необходимых видов клеток. Если полипептиды получают рекомбинантными методами, могут быть использованы любые известные специалистам в данной области методы идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих желаемые гены. Для получения, например, из клеток или тканей полноразмерных (т.е. охватывающих всю кодирующую область) кДНК или геномных ДНК, кодирующих фермент PH20, может быть использован любой метод, известный в уровне техники. Модифицированные полипептиды или варианты полипептидов, в том числе усеченные формы, например, предусмотренные в данном изобретении, могут быть получены из полипептида дикого типа с применением стандартных технологий рекомбинантной ДНК.

Полипептиды можно клонировать или выделять с помощью любых известных в уровне техники методов клонирования и выделения молекул нуклеиновых кислот. Такие методы включают

ПЦР-амплификацию нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, включая скрининг гибридизацией нуклеиновых кислот, скрининг с помощью антител и скрининг по активности.

Для выделения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый полипептид, могут быть использованы методы амплификации нуклеиновых кислот, включая, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР). ПЦР может быть проведена с использованием любых известных в уровне техники процедур и методов. Например, могут быть использованы ПЦР-амплификатор Perkin-Elmer Cetus и Taq-полимеразы (от Gene Amp). В качестве исходного материала, из которого может быть выделена желаемая кодирующая полипептид молекула нуклеиновой кислоты, может быть использован содержащий нуклеиновые кислоты материал. Например, в методах амплификации могут быть использованы препараты ДНК и РНК, клеточные экстракты, тканевые экстракты из подходящих источников (например, яичек, предстательной железы, молочной железы), образцы жидкостей (например, крови, сыворотки, слюны), образцы, взятые у здоровых и/или больных субъектов. Нуклеиновые кислоты могут быть получены из любого вида эукариот, включая, но не ограничиваясь позвоночными животными, млекопитающими, человеком, свиньей, быком, кошкой, птицами, лошадьми, собаками, приматами. В качестве источника исходного материала также могут быть использованы библиотеки нуклеиновых кислот. Для амплификации желаемого полипептида могут быть разработаны соответствующие праймеры. Например, праймеры могут быть разработаны на основе экспрессируемых последовательностей, с которых был синтезирован желаемый полипептид. Праймеры могут быть разработаны на основе обратной трансляции аминокислотной последовательности полипептида. При необходимости, для амплификации могут быть использованы вырожденные праймеры. В качестве праймеров для амплификации последовательности из образца нуклеиновых кислот методом ПЦР могут быть использованы олигонуклеотидные затравки, которые гибридизуются с последовательностями на 3' и 5' конце желаемой последовательности. Праймеры могут быть использованы для амплификации всей полноразмерной последовательности РН20 или ее усеченной последовательности, например, последовательности, кодирующей любой из предусмотренных в данном изобретении растворимых полипептидов РН20. Для подтверждения кодирования желаемого полипептида может быть определена последовательность молекул нуклеиновых кислот, полученных в результате амплификации.

К кодирующей полипептид молекуле нуклеиновой кислоты могут быть присоединены дополнительные нуклеотидные последовательности, в том числе линкерные последовательности, содержащие сайты рестрикции для клонирования синтетического гена в вектор, например, в вектор экспрессии белка или в вектор, предназначенный для амплификации кодирующей белок последовательности ДНК. Кроме того, с кодирующей полипептид молекулой нуклеиновой кислоты могут быть функционально связаны дополнительные нуклеотидные последовательности, являющиеся функциональными элементами ДНК. Примеры таких последовательностей включают, но не ограничиваются промоторными последовательностями, способствующими внутриклеточной экспрессии белка, и последовательностями для секреции, например гетерологичными сигнальными последовательностями, предназначенными для облегчения секреции белка. Такие последовательности известны специалистам в данной области. Примеры гетерологичных сигнальных последовательностей включают, но не ограничиваются гетерологичными сигнальными последовательностями IgG каппа человека и мыши, приведенными в SEQ ID NO: 144 и 145, соответственно. Дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, кодирующие связывающие белки районы, также могут быть связаны с кодирующей фермент молекулой нуклеиновой кислоты. Такие районы включают, но не ограничиваются последовательностями остатков, которые способствуют поглощению фермента конкретными клетками-мишенями или которые кодируют белки, способствующие такому поглощению, или которые иным образом изменяют фармакокинетику продукта синтетического гена.

Кроме того, к полипептиду могут быть добавлены метки или другие фрагменты, например, способствующие обнаружению или аффинной очистке полипептида. Например, с кодирующей фермент молекулой нуклеиновой кислоты могут быть связаны дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, кодирующие эпитопную метку или другой обнаруживаемый маркер. Примеры таких последовательностей включают последовательности нуклеотидов, кодирующие His-метку (например, 6×His, НННННН; SEQ ID NO: 54) или Flag-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 55).

Идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в соответствующий вектор клонирования. Может быть использовано большое количество известных в уровне техники систем вектор-хозяин. Возможные векторы включают, но не ограничиваются плазмидами или модифицированными вирусами, причем векторная система должна быть совместима с используемой клеткой-хозяином. Такие векторы включают, но не ограничиваются бактериофагами, такими как производные бактериофага лямбда, или плазмидами, такими как pCMV4, pBR322 или pUC плазмиды, или производные вектора Bluescript (Stratagene, La Jolla, Калифорния). Другие векторы экспрессии включают вектор экспрессии HZ24, приведенный в качестве примера в данном изобретении (приведен в SEQ ID NO: 140). Вставка в вектор для клонирования, например, может быть осуществлена лигированием фрагмента ДНК в вектор клонирования, который обладает комплементарными липкими концами. Если для фрагментации

ДНК использовали комплементарные сайты рестрикции, которых нет в векторе клонирования, концы молекулы ДНК могут ферментативно модифицированы. Кроме того, любой желаемый сайт может быть получен лигированием нуклеотидных последовательностей (линкеров) на концах ДНК, эти лигированные линкеры могут содержать специфические химически синтезированные олигонуклеотиды, кодирующие последовательность, распознаваемую эндонуклеазой рестрикции. В альтернативном методе расщепленный вектор и ген белка могут быть модифицированы достраиванием гомополимерного хвоста. Вставка может осуществляться с использованием векторов клонирования ТОРО (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния). В конкретных вариантах трансформация клеток-хозяев рекомбинантными молекулами ДНК, которые включают выделенный ген белка, кДНК или синтезированные последовательности ДНК, позволяет получать множество копий гена. Таким образом, ген может быть получен в больших количествах в растущих трансформантах с последующим выделением рекомбинантных молекул ДНК из трансформантов и, при необходимости, получением вставленного гена из выделенной рекомбинантной ДНК.

В дополнение к рекомбинантному получению растворимые РН20, включая любые esРН20 по настоящему документу, могут быть получены прямым пептидным синтезом твердофазным методом (см., например, Stewart и др. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co, Сан Франциско; Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). *In vitro* синтез белка может быть проведен вручную или может быть автоматизирован. Автоматизированный синтез может быть проведен, например, с помощью пептидного синтезатора Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Различные фрагменты полипептида могут быть химически синтезированы по отдельности и объединены с помощью химических методов.

1. Векторы и клетки.

Для рекомбинантной экспрессии одного или более желаемых белков, таких как любые описанные здесь белки, нуклеиновые кислоты, содержащие всю кодирующую белок нуклеотидную последовательность или ее часть, могут быть вставлены в соответствующий вектор экспрессии, т. е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей белок последовательности. Необходимые сигналы транскрипции и трансляции также могут содержаться в нативном промоторе гена РН20 и/или в его фланкирующих районах.

Кроме того, предусмотрены векторы, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие фермент. Клетки, содержащие векторы, также предусмотрены. Клетки включают эукариотические клетки и прокариотические клетки, и векторы представляют собой любые подходящие для использования в них векторы.

Предусмотрены прокариотические и эукариотические клетки, включая клетки эндотелия, содержащие векторы. Такие клетки включают бактериальные клетки, клетки дрожжей, клетки грибов, археи, растительные клетки, клетки насекомых и животные клетки. Клетки используют для получения белка с помощью выращивания описанных выше клеток в условиях, в которых закодированные белки экспрессируются клеткой, и выделения экспрессированного белка. В настоящем изобретении, например, растворимые полипептиды РН20, включая длинные растворимые полипептиды РН20, могут быть секретированы в среду.

Штамм клеток-хозяев может быть выбран по его способности к экспрессии введенной последовательности или по способности к нужному процессингу экспрессированного белка. Процессинг полипептида включает, но не ограничивается ацетилизацией, карбоксилизацией, гликозилизацией, фосфорилированием, присоединением липидов и ацилизацией. Посттрансляционный процессинг может повлиять на фолдинг и/или функционирование полипептида. Различные клетки-хозяева, включая, но не ограничиваясь CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 и WI38, обладают специфическими клеточными инструментами и характерными механизмами для пост-трансляционной модификации, и поэтому могут быть выбраны для правильной модификации и процессинга введенного белка. Как правило, выбирают такой тип клеток, который способен провести N-гликозилирование экспрессированного полипептида. Таким образом, предусмотрены эукариотические клетки, содержащие векторы. Примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO). Например, для получения предусмотренных в данном изобретении полипептидов используют дефицитные по дигидрофолатредуктазе клетки CHO (например, клетки DG44). Бактериальная экспрессия растворимых длинных РН20 или укороченных с С-конца РН20 по настоящему документу не приведет к каталитически активному полипептиду, но при наличии надлежащих ферментов гликозилирования РН20 может быть искусственно гликозилирован.

Изобретение включает векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, кодирующую полипептид гиалуронидазы, включая длинные растворимые полипептиды РН20 и укороченные с С-конца РН20, связанные с нативной или гетерологичной сигнальной последовательностью, или несколькими ее копиями. Векторы могут быть выбраны для экспрессии фермента в клетке, вектор также может обеспечивать секрецию экспрессированного фермента.

Для экспрессии кодирующей последовательности белка могут быть использованы различные системы хозяин-вектор. Они включают, но не ограничиваются системами клеток млекопитающих, инфицированных вирусом (например, вирусом осповакцины, аденовирусом и другими вирусами); системами

клеток насекомых, инфицированных вирусом (например, бакуловирусом); микроорганизмами, такими как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы, или бактериями, трансформированными бактериофагом, ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Экспрессионные элементы векторов варьируют по силе и специфичности. В зависимости от используемой системы хозяин-вектор может быть использован любой подходящий транскрипционный и трансляционный элемент.

Для конструирования векторов экспрессии, содержащих химерный ген, включающий соответствующие сигналы контроля транскрипции/трансляции и кодирующие белок последовательности, могут быть использованы любые методы вставки фрагментов ДНК в вектор, известные специалистам в данной области. Эти методы могут включать рекомбинацию и синтез ДНК *in vitro* или рекомбинацию *in vivo* (генетическую рекомбинацию). Экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, его домены, производные, фрагменты или гомологи, можно регулировать с использованием второй последовательности нуклеиновой кислоты, которая приводит к экспрессии генов или их фрагментов в трансформированном молекулой (молекулами) рекомбинантной ДНК хозяине. Например, экспрессией белков можно управлять с помощью любого промотора/энхансера, известного в уровне техники. В одном варианте промотор не является нативным для генов желаемого белка. Промоторы, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ранним промотором SV40 (Berneis и Chambon, *Nature* 290: 304-310 (1981)), промотором, содержащимся в 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Пауца (Yamamoto и др., *Cell* 22:781-791 (1980)), промотором тимидинкиназы герпеса (Wagner и др., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 75:1441-1445 (1981)), регуляторными последовательностями гена металлотронеина (Brinster и др., *Nature* 296:39-42 (1982)), промоторами прокариотических векторов экспрессии, включающими промотор β -лактамазы (Jay и др., (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 75: 5543) или *tac* промотор (DeBoer и др., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80:21-25 (1983)), см. также "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" в журнале *Scientific American* 242:79-94 (1980); векторы экспрессии растений включают промотор нопалин-синтетазы (Herrera-Estrella и др., *Nature* 305:209-213 (1984)), промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (Gardner и др., *Nucleic Acids Res.* 9:2871 (1981)) и промотор фермента фотосинтеза рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Herrera-Estrella и др., *Nature* 310: 115-120 (1984)); промоторные элементы дрожжей и других грибов включают промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор фосфоглицеролкиназы, промотор щелочной фосфатазы; районы контроля транскрипции животных, которые проявляют тканеспецифичность и которые были использованы в трансгенных животных, включают контролирующий район гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift и др., *Cell* 35:639-646 (1984); Ornitz и др., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); контролирующий район гена инсулина, активный в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan и др., *Nature* 315: 115-122 (1985)), контролирующий район генов иммуноглобулинов, который активен в лимфоидных клетках (Grosschedl и др., *Cell* 35:647-658 (1984); Adams и др., *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander и др., *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987)), контролирующий район вируса опухоли молочной железы мыши, активный в яичках, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder и др., *Cell* 45:485-495 (1986)), контролирующий район гена альбумина, активный в печени (Pinckert и др., *Genes and Devel.* 7:268-276 (1987)), контролирующий район гена альфа-фетобелка, активный в печени (Krumlauf и др., *Mol. Cell Biol.* 5: 1639-1648 (1985); Hammer и др., *Science* 235: 53-58 (1987)), контролирующий район гена альфа-1-антитрипсина, активный в печени (Kelsey и др., *Genes and Devel* 7: 161-171 (1987)), контролирующий район гена бета-глобина, активный в миелоидных клетках (Mogam и др., *Nature* 375:338-340 (1985); Kollias и др., *Cell* 46:89-94 (1986)), контролирующий район гена основного белка миелина, активный в олигодендроцитах мозга (Readhead и др., *Cell* 45:703-712 (1987)), контролирующий район гена легких цепей-2 миозина, активный в скелетных мышцах (Shani, *Nature* 374:283-286 (1985)) и контролирующий район гена гонадотропного рилизинг-гормона, активный в гонадотрофитах гипоталамуса (Mason и др., *Science* 234: 1372-1378 (1986)).

В конкретном варианте используют вектор, который содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок РН20 или его домен, фрагмент, производное или гомолог, вектор также содержит одну или несколько точек начала репликации и, по желанию, один или более селективных маркеров (например, ген устойчивости к антибиотику). В зависимости от системы экспрессии для эффективной трансляции последовательности РН20 также необходимы специфические сигналы инициации. Указанные сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Если иницирующий кодон и вышерасположенные последовательности РН20 или ее растворимой формы вставлены в соответствующий вектор экспрессии, никаких дополнительных сигналов контроля трансляции не требуется. Если в вектор экспрессии введена только кодирующая последовательность или ее часть, должны быть предусмотрены экзогенные сигналы контроля трансляции, включая иницирующий кодон ATG. Кроме того, для правильной транскрипции всей вставки иницирующий кодон должен быть в правильной рамке считывания. Экзогенные транскрипционные элементы и иницирующий кодон могут быть различного происхождения, могут быть природными и синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена за счет введения подходящих для используемой клеточной системы энхансеров (Scharf и др., (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner и др., (1987) *Methods in Enzymol*, 153: 516-544).

Примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pQE (доступные от Qiagen, Valencia, Калифорния, см. также литературу, опубликованную Qiagen для описания системы). pQE вектор включает промотор бактериофага T5 (распознается РНК-полимеразой *E.coli*), двойной участок репрессии в Lac-операторе для жестко регулируемой высокой экспрессии рекомбинантных белков в *E.coli*, синтетический сайт связывания рибосом (RBS II) для эффективной трансляции, последовательность, кодирующую 6×His метку, t_0 и T1 терминаторы транскрипции, точку начала репликации ColEI и ген бета-лактамазы для устойчивости к ампициллину. pQE вектор позволяет присоединять 6×His метку на N-конце или C-конце рекомбинантного белка. Такие плазмиды включают pQE 32, pQE 30 и pQE 31, которые включают сайты множественного клонирования для всех трех рамок считывания и обеспечивают экспрессию белков с N-концевой 6×His меткой. Другие примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pET (см., патент США 4952496; вектор доступен от Novagen, Madison, Висконсин, см. также опубликованную Novagen литературу с описанием системы). Такие плазмиды включают pET11a, которая содержит промотор T7lac, T7 терминатор, индуцируемый lac-оператор *E.coli* и ген lac-репрессора; pET12a-c, которая содержит промотор T7, терминатор T7 и сигнал секреции ompT из *E.coli*; pET15b и pET19b (Novagen, Madison, Висконсин), которые содержат лидерную последовательность His-Tag™ для очистки на His колонке и сайт расщепления тромбином, который позволяет осуществить расщепление после очистки на колонке, T7-lac промоторный район и T7 терминатор.

Примером вектора для экспрессии в клетках млекопитающих является вектор экспрессии HZ24. Вектор экспрессии HZ24 был получен из вектора pCI (Promega). Он содержит ДНК, кодирующую бета-лактамазный ген устойчивости (AmpR), точку начала репликации F1, немедленный ранний энхансерный/промоторный район цитомегаловируса (CMV) и поздний сигнал полиаденилирования SV40 (SV40). Вектор экспрессии также включает внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) от вируса ECMV (Clontech) и ген дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR). Трансфецированные таким вектором клетки можно культивировать в среде с химически определенным составом в отсутствие гипоксантина и тимидина, после чего при увеличении концентрации метотрексата в среде можно добиться дополнительной амплификации гена. Указанные методы описаны здесь в Примерах 13 и 15.

2. Экспрессия.

Полипептиды PH20, в том числе полипептиды esPH20 и укороченные с C-конца полипептиды PH20 по настоящему документу могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области, в том числе *in vivo* и *in vitro* методами. Желаемые белки могут быть экспрессированы в любом организме, подходящем для получения необходимого количества белка и необходимой формы белка, требуемых для введения и лечения. Хозяева в системах экспрессии включают прокариотические и эукариотические организмы, такие как *E. coli*, дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих, в том числе клеточные линии человека, и трансгенные животные. Хозяева систем экспрессии могут отличаться уровнями экспрессии белка, а также типом посттрансляционных модификаций, которые присутствуют на экспрессированных белках. Выбор хозяина системы экспрессии может быть сделан на основе перечисленных и других факторов, таких как нормативные ограничения и соображения безопасности, издержки производства, необходимость очистки и способы очистки.

Множество векторов экспрессии доступно и известно специалистам в данной области, и может быть использовано для экспрессии белков. Выбор вектора экспрессии зависит от выбора хозяина системы экспрессии. В общем, векторы экспрессии могут включать транскрипционные промоторы и, по желанию, энхансеры, сигналы трансляции и сигналы терминирования транскрипции и трансляции. Векторы экспрессии, которые используют для стабильной трансформации, обычно имеют селективные маркеры, которые позволяют отбирать и поддерживать трансформированные клетки. В некоторых случаях для амплификации вектора могут быть использованы точки начала репликации.

Растворимые полипептиды гиалуронидазы, в том числе esPH20 и другие укороченные с C-конца полипептиды PH20, также могут быть использованы или экспрессированы в виде белков слияния. Например, может быть получен слитый фермент с дополнительной функцией. Примеры слитых ферментов включают, но не ограничиваются белками слияния с сигнальными последовательностями, такими как метки для локализации, такие как his₆ метка или тус метка, или метки для очистки, такие как GST, белками слияния с последовательностями для направления секреции белков и/или ассоциации с мембраной и с другими последовательностями, применяемыми для увеличения периода полураспада, например, последовательностью Fc.

Для длительной высокопроизводительной продукции рекомбинантных белков необходима их стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, стабильно экспрессирующие растворимую PH20, такую как esPH20 или другой укороченный с C-конца полипептид PH20, могут быть трансформированы вектором экспрессии, содержащим точку начала репликации вируса, эндогенные элементы экспрессии и маркерный ген для отбора. После введения вектора клетки можно культивировать в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем перенести на селективную среду. Селективный маркер придает трансформантам свойство устойчивости при селекции, и его присутствие позволяет культивировать и поддержи-

вать клетки, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Проллиферацию устойчивых стабильно трансформированных клеток можно поддерживать с применением приемлемых для соответствующего типа клеток методов культивирования тканей.

Для поддержания трансформированных клеточных линий может быть использовано любое количество систем селекции. Системы включают, но не ограничиваются системами с генами тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. и др., (1977) Cell, 11: 223-32.) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I. и др., (1980) Cell, 22: 817-23), которые могут быть использованы в ТК- или APRT-клетках, соответственно. Кроме того, в качестве основы для селекции может быть использована устойчивость к анти-метаболитам, антибиотикам и гербицидам. Например, могут быть использованы ген DHFR, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. и др., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); ген npt, который придает устойчивость к аминогликозидам неомицину и G-418 (Colbere-Garapin F. и др., (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14); и гены als или pat, которые придают устойчивость к хлорсульфурону и фосфинотирицину, соответственно. Были описаны дополнительные гены для отбора, например, trpB, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (Hartman SC и Mulligan RC (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51). Для идентификации трансформантов, а также количественной оценки временной или стабильной экспрессии белка при использовании определенной векторной системы также могут быть использованы видимые маркеры, включая, но не ограничиваясь антоцианами, бета-глюкуронидазой и et субстратом, GUS? и люциферазой и ее субстратом люциферин (Rhodes CA и др., (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

Наличие экспрессии и уровень экспрессии растворимых полипептидов PH20, в том числе esPH20 и других усеченных с С-конца полипептидов PH20, могут быть установлены. Например, наличие функциональных полипептидов может быть определено путем исследования кондиционированной среды на гиалуронидазную ферментативную активность при соответствующих условиях. В разделе G ниже представлены примеры анализов для оценки растворимости и активности экспрессированных белков.

а. Прокариотические клетки.

Прокариоты, особенно *E. coli*, представляют собой системы для получения большого количества белка. Трансформация *E. coli* представляет собой простой и быстрый метод, хорошо известный специалистам в данной области. Векторы экспрессии *E. coli* могут содержать индуцибельный промотор, полезный для стимулирования высоких уровней экспрессии белка и для экспрессии белков, которые проявляют токсичность для клеток-хозяев. Примеры индуцибельных промоторов включают lac-промотор, trp промотор, гибридный тас промотор, T7 и SP6 PHK промоторы и термочувствительный λP_L промотор.

Белок, такой как любой предусмотренный в данном изобретении белок, может быть экспрессирован в цитоплазматической среде *E. coli*. Цитоплазма представляет собой восстановительную среду, и для некоторых молекул это может привести к образованию нерастворимых телец включения. Для ресольubilизации белков могут быть использованы восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол и β -меркаптоэтанол, и денатурирующие агенты, такие как гуанидин-HCl и мочевины. Альтернативный подход состоит в экспрессии белка в периплазматическом пространстве бактерий, которое предоставляет окислительную среду, шаперонин-подобные белки и дисульфидизомеразы, что приводит к образованию растворимого белка. Как правило, с экспрессируемым белком сливают лидерную последовательность, которая направляет белок в периплазму. Затем лидерная последовательность удаляется сигнальной пептидазой внутри периплазмы. Примеры лидерных последовательностей, направляющих белки в периплазму, включают лидерную последовательность гена пектатлиазы *pelB* и лидерную последовательность гена щелочной фосфатазы. В некоторых случаях периплазматическая экспрессия приводит к утечке экспрессированного белка в культуральную среду. Секреция белков позволяет быстро и просто очистить белки от культурального супернатанта. Не секретрируемые белки могут быть получены из периплазмы с помощью осмотического лизиса. Как и при цитоплазматической экспрессии в некоторых случаях белки могут стать нерастворимыми, и для облегчения растворения и рефолдинга белков могут быть использованы денатурирующие агенты и восстановители. Температуры индукции и культивирования также могут влиять на уровень экспрессии и растворимость белков, как правило, используются температуры между 25 и 37°C. Как правило, бактерии производят агликозилированные белки. Таким образом, если для функционирования белки требуют гликозилирования, то гликозилирование может быть осуществлено *in vitro* после очистки из клетки-хозяина.

б. Клетки дрожжей.

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Pichia pastoris*, являются хорошо известными дрожжевыми хозяевами систем экспрессии и могут быть полезны для получения белков, таких как описанные в данном изобретении. Дрожжи могут быть трансформированы эписомными репликативными векторами или стабильной интеграцией в хромосомы путем гомологичной рекомбинации. Как правило, для регуляции экспрессии генов используют индуцируемые промоторы. Примеры таких промоторов включают промоторы GAL1, GAL7, GAL5 и металлотионеиновые промоторы, такие как CUP1, AOX или другие промоторы *Pichia* или других дрожжей. Для отбора и поддержания трансформированной ДНК векторы экспрессии часто включают

селективные маркеры, такие как LEU2, TRP1, HIS3 и URA3. Экспрессируемые в дрожжах белки часто являются растворимыми, а коэкспрессия с шаперонинами, такими как *Вир* и протеиндисульфидизомераза, может повысить уровень экспрессии и растворимость белка. Кроме того, экспрессируемые в дрожжах белки могут быть направлены для секреции с использованием слитого сигнального пептида секреции, такого как сигнал секреции альфа-фактора типа спаривания дрожжей из *Saccharomyces cerevisiae*, и слитого сигнального пептида белков поверхности клетки дрожжей, таких как адгезивный рецептор спаривания *Aga2p* или глюкоамилаза *Arxula adeninivorans*. Для удаления слитой последовательности из полипептидов после секреции может быть введен сайт расщепления протеазой (например, протеазой *Kex-2*). Дрожжи также способны к гликозилированию мотива Asn-X-Ser/Thr.

с. Клетки насекомых.

Клетки насекомых, в частности при использовании системы бакуловирусной экспрессии, полезны для экспрессии полипептидов, таких как полипептиды гиалуронидазы. Клетки насекомых экспрессируют высокие уровни белка и способны осуществлять большинство посттрансляционных модификаций высших эукариот. Бакуловирусы имеют ограниченный диапазон хозяев, что повышает безопасность и снижает нормативные ограничения, присущие системам эукариотической экспрессии. Как правило, в векторах экспрессии для высокого уровня экспрессии белка используют промотор полиэдрин бакуловируса. Обычно используемые бакуловирусные системы включают такие бакуловирусы как вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) и вирус ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (BmNPV) и линии клеток насекомых, такие как Sf9, полученная из *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1). Для достижения высокого уровня экспрессии нуклеотидную последовательность молекулы, которая будет экспрессирована, присоединяют непосредственно после инициаторного кодона полиэдрин вируса. Сигналы секреции млекопитающих точно процессируются в клетках насекомых и могут быть использованы для секреции экспрессированного белка в культуральную среду. Кроме того, клеточные линии *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1) производят белки, гликозилирование которых похоже на гликозилирование в клеточных системах млекопитающих. Примеры клеток насекомых включают клетки, которые были модифицированы для уменьшения иммуногенности, включая модифицированные бакуловирусными векторами экспрессии клетки и клетки, в которых отсутствует фермент FT3.

Альтернативной системой экспрессии в клетках насекомых является использование стабильно трансформированных клеток. Для экспрессии могут быть использованы такие клеточные линии, как Schnieder 2 (S2), Kc клетки (*Drosophila melanogaster*) и C7 клетки (*Aedes albopictus*). Для достижения высокого уровня экспрессии может быть использован промотор металлотионеина *Drosophila* с индукцией тяжелыми металлами кадмием и медью. Векторы экспрессии, как правило, поддерживают за счет использования селективных маркеров, таких как неомизин и гиромизин.

d. Клетки млекопитающих.

Для экспрессии белков, включая полипептиды растворимой гиалуронидазы, могут быть использованы системы экспрессии млекопитающих. Экспрессионные конструкции могут быть введены в клетки млекопитающих посредством вирусной инфекции, например, с помощью аденовируса, или путем прямого переноса ДНК, например, с помощью липосом, фосфата кальция, ДЭАЭ-декстрана и физических методов, таких как электропорация и микроинъекция. Векторы экспрессии для клеток млекопитающих обычно включают сайт экспонирования мРНК, ТАТА-бокс, последовательность инициации трансляции (консенсусную последовательность Козака) и элементы полиаденилирования. Для бицистронной экспрессии с другим геном, таким как селективный маркер, могут быть использованы IRES элементы. Такие векторы для достижения высокого уровня экспрессии часто включают промоторы и энхансеры транскрипции, например промотор-энхансер SV40, промотор цитомегаловируса человека (CMV) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (RSV). Указанные промоторы-энхансеры действуют во многих типах клеток. Также для экспрессии могут быть использованы тканеспецифичные и специфичные к определенным типам клеток промоторы и энхансерные районы. Примеры промоторных/энхансерных районов включают, но не ограничиваются районами из таких генов, как ген эластазы I, ген инсулина, гены иммуноглобулинов, промоторным/энхансерным районом вируса опухоли молочной железы мыши, гена альбумина, гена альфа-фетобелка, альфа-1-антитрипсина, бета-глобина, основного белка миеллина, легкой цепи-2 миозина и гонадотропного рилизинг-гормона. Для отбора и поддержания клеток с экспрессионными конструкциями могут быть использованы селективные маркеры. Примеры селективных маркеров включают, но не ограничиваются генами гиромизин-В-фосфотрансферазы, аденозиндезаминазы, ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы, аминокликозидфосфотрансферазы, дигидрофолатредуктазы (DHFR) и тимидинкиназы. Например, экспрессию можно проводить в присутствии метотрексата для отбора клеток, экспрессирующих ген дигидрофолатредуктазы. Слитые с сигнальными молекулами клеточной поверхности, такими как TCR- ζ и $Fc\epsilon RI$ - γ , белки могут непосредственно экспрессироваться в активном состоянии на поверхность клеток.

Для экспрессии в млекопитающих доступны многие клеточные линии, включая клетки мыши, крысы, человека, обезьяны, курицы и хомяка. Примеры линий клеток включают, но не ограничиваются CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, мышинными NSO (не секретирующие) и другими клеточными линиями миеломы,

гибридными и гетерогибридными клеточными линиями, лимфоцитами, фибробластами, SP2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8 и НКВ клетками. Также доступны адаптированные к бессывороточной среде клеточные линии, что облегчает очистку секретируемых белков из культуральной среды. Примеры включают клетки CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния, лот # 11619-012) и бессывороточную линию клеток EBNA-I (Pham и др., (2003) *Biotechnol Bioeng.* 84:332-42). Также доступны линии клеток, адаптированные для роста в специальной среде, оптимизированной для максимальной экспрессии. Например, клетки CHO DG44 адаптированы для роста в суспензионной культуре в свободной от продуктов животного происхождения среде с химически определенным составом.

е. Растения.

Для экспрессии белков, таких как любые описанные в настоящем изобретении белки, могут быть использованы трансгенные клетки растений и трансгенные растения. Экспрессионные конструкции, как правило, переносят в растения с использованием прямого переноса ДНК, такого как бомбардировка микрочастицами и ПЭГ-опосредованный перенос в протопласты, или с использованием агробактериальной трансформации. Векторы экспрессии могут включать промоторные и энхансерные последовательности, элементы терминации транскрипции и элементы контроля трансляции. Векторы экспрессии и методы трансформации, как правило, отличаются для двудольных хозяев, таких как *Arabidopsis* и табак, и однодольных хозяев, таких как кукуруза и рис. Примеры промоторов растений, используемых для экспрессии, включают промотор вируса мозаики цветной капусты, промотор нопалинсинтазы, промотор рибулозобисфосфаткарбоксилазы и промотор убиквитина и UBQ3. Для облегчения отбора и поддержания трансформированных клеток часто используют селективные маркеры, такие как гигромицин, фосфоманнозоизомеразы и неомицинфосфотрансфераза. Трансформированные клетки растений можно поддерживать в культуре в виде клеток, агрегатов (каллусной ткани) или регенерировать в целые растения. Трансгенные клетки растений также могут включать генетически модифицированные водоросли, предназначенные для получения полипептидов гиалуронидазы. Поскольку паттерны гликозилирования у растений отличаются от гликозилирования в клетках млекопитающих, это может повлиять на выбор белков, продуцируемых в этих хозяевах.

3. Способы очистки.

Клетки, трансформированные нуклеиновой кислотой с последовательностью, кодирующей растворимый РН20, в том числе esРН20 и другие усеченные с С-конца полипептиды РН20, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и получения из клеточной культуры закодированного белка. Вырабатываемый рекомбинантной клеткой белок, как правило, секретируется, но может также содержаться внутри клетки в зависимости от последовательности и/или используемого вектора. Специалистам в данной области очевидно, что вектор экспрессии, содержащий кодирующую РН20 нуклеиновую кислоту, может включать сигнальную последовательность, облегчающую прямую секрецию РН20 через прокариотическую или эукариотическую клеточную мембрану.

Следовательно, способы очистки полипептидов из клетки-хозяина зависят от выбранной клетки-хозяина и системы экспрессии. В случае секреции белки, в общем, являются очищенными из культуральной среды после удаления клеток. В случае внутриклеточной экспрессии клетки могут быть лизированы, и белки очищают из экстракта. Если для экспрессии используют трансгенные организмы, такие как трансгенные растения и животные, в качестве исходного материала для получения экстракта лизированных клеток могут быть использованы ткани или органы. Кроме того, получение белков в трансгенных животных может включать получение полипептидов в молоке или яйцах, которые могут быть собраны, и затем при необходимости белки могут быть выделены и очищены с использованием стандартных способов, известных в уровне техники.

Белки, такие как растворимые полипептиды РН20, включая esРН20 и другие усеченные с С-конца полипептиды РН20, могут быть очищены с использованием стандартных способов очистки белков, известных в уровне техники, включая, но не ограничиваясь SDS-PAGE, эксклюзионной хроматографией, хроматографией по размеру, осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией, такой как анионообменная хроматография. Для увеличения эффективности очистки и улучшения чистоты получаемых препаратов может быть использована аффинная очистка. Например, для аффинной очистки могут быть использованы антитела, рецепторы и другие молекулы, которые связывают гиалуронидазу. Например, растворимые РН20 могут быть очищены из кондиционированной среды.

В экспрессионных конструкциях к белку может быть добавлена аффинная метка, такая как тус-эпитоп, гибридная последовательность GST или His₆, и аффинная очистка может быть проведена с помощью тус-антител, смолы с глутатионом и Ni-смолы, соответственно. Такие метки, которые могут облегчить очистку растворимых белков, могут быть присоединены к нуклеотидной последовательности, кодирующей растворимую РН20, как описано в данном изобретении. Например, растворимая РН20 может быть экспрессирована в виде рекомбинантного белка с одним или несколькими дополнительными полипептидными доменами, добавленными для облегчения очистки белка. Такие облегчающие очистку домены включают, но не ограничиваются хелатирующими металлы пептидами, такими как гистидин-триптофановые модули, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованных металлах, доменами белка А, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованных иммуноглобулинах, и доме-

нами, применяемыми в системах аффинной очистки FLAGS (Immunex Corp., Сизтл, штат Вашингтон). Облегчению очистки способствует включение между доменом для очистки и экспрессированным полипептидом PH20 расщепляемой, например, фактором Ха или энтерокиназой (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) линкерной последовательности. Один из экспрессионных векторов для экспрессии гибридного белка, содержащего растворимый PH20, включает последовательность нуклеотидов, кодирующую 6 остатков гистидина, тиоредоксин и сайт расщепления энтерокиназы. Остатки гистидина предназначены для очистки методом ИМАС (аффинная хроматография с иммобилизованными ионами металла), в то время как сайт расщепления энтерокиназой позволяет очистить полипептид из слитого белка.

Чистота может быть оценена любым способом, известным в уровне техники, включая гель-электрофорез, двумерная ВЭЖХ, окрашивание и спектрофотометрические методы. Экспрессированный и очищенный белок может быть проанализирован с помощью любого анализа или метода, известного специалисту в данной области, например, любого метода, описанного в разделе G. Анализы основаны на физических и/или функциональных свойствах белка, включая, но не ограничиваясь анализом методом гель-электрофореза, иммуноферментным анализом и анализом на гиалуронидазную активность.

В зависимости от используемой системы экспрессии и клетки-хозяина из-за присутствующих в культуральной среде при продукции и очистке полипептидов пептидаз полученные полипептиды могут быть гетерогенны. Например, получение растворимых PH20 в клетках CHO может привести к смеси гетерогенных полипептидов. Пример протокола для конструирования, продукции и очистки растворимых PH20 (например, rHuPH20) описан в Примерах 13-15 ниже. Аналогично, например, экспрессия нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с последовательностью аминокислот 36-497, приведенной в SEQ ID NO: 60, может привести к гетерогенной смеси полипептидов переменного состава, включающей, например, укороченные с С-конца полипептиды из 497, 496, 495, 494, 493, 492, 491, 490, 489 аминокислот или менее.

F. Анализы.

Растворимые полипептиды PH20 по настоящему документу, в том числе полипептиды esPH20, являются растворимыми и сохраняют ферментативную гиалуронидазную активность. N-гликозилированные или частично N-гликозилированные полипептиды PH20 по настоящему документу сохраняют гиалуронидазную ферментативную активность. Активность предусмотренных в данном изобретении PH20 составляет приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% и более от активности соответствующих PH20, которые не укорочены с С-конца или полностью N-гликозилированы. Активность растворимых гиалуронидаз PH20, таких как esPH20, можно оценить с помощью методов, хорошо известных в уровне техники. Указанные методы включают, например, анализ микромутности и микротитровальный с применением биотинилированной гиалуроновой кислоты. Может быть измерена гиалуронидазная активность в кондиционированной среде, супернатанте или гиалуронидазная активность очищенного белка. Растворимость белка также может быть измерена, например, с помощью анализа с Тритон® X-114. Во всех анализах активность или растворимость растворимого PH20 можно сравнить с характеристиками контрольного образца, например, не усеченного с С-конца полноразмерного полипептида PH20.

1. Гиалуронидазная активность.

Активность растворимого полипептида PH20 можно оценить с помощью хорошо известных в данной области методов. Например, в анализе на гиалуронидазную активность Фармакопеи США (USP) XXII гиалуронидазную активность определяют косвенно путем измерения количества недеградированной гиалуроновой кислоты или гиалуронана (ГК), оставшегося после реакции фермента с ГК в течение 30 мин при 37°C (USP-NF XXII XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc, Rockville, Мэриленд). Для определения активности препарата любой гиалуронидазы в единицах активности может быть использован стандарт сравнения гиалуронидазы (USP) или стандартный раствор гиалуронидазы Национального формуляра (NF).

В одном из примеров активность измеряют с помощью анализа микромутности, как описано в Примере 12. Метод основан на образовании нерастворимого осадка при связывании гиалуроновой кислоты с сывороточным альбумином. Активность измеряют с помощью инкубации гиалуронидазы с гиалуронатом натрия (гиалуроновой кислотой) в течение определенного периода времени (например, 10 минут) и последующего осаждения нерасщепленного гиалуроната натрия при добавлении подкисленного сывороточного альбумина. Мутность образца измеряют при 640 нм после дополнительного периода инкубации. Снижение мутности в результате активности гиалуронидазы по отношению к гиалуронату натрия является показателем ферментативной активности гиалуронидазы.

В другом примере активность гиалуронидазы измеряют с помощью микротитрования, при котором оставшуюся биотинилированную гиалуроновую кислоту определяют после инкубации с гиалуронидазой (см., например, Frost и Stern (1997) Anal. Biochem. 251:263-269, опубликованную заявку США № 20050260186). В Примере 4 гиалуронидазную активность усеченной человеческой гиалуронидазы PH20 определяют с использованием биотинилированной гиалуроновой кислоты. Свободные карбоксильные группы глюконовых остатков гиалуроновой кислоты биотинилированы, и биотинилированная гиалуроновая кислота ковалентно связана с планшетом. После инкубации с гиалуронидазой остаточную био-

тинилованную гиалуроновую кислоту определяют с помощью авидин-пероксидазной реакции и ее количество сравнивают с количеством гиалуроновой кислоты после реакции со стандартом гиалуронидазы известной активности. Так как субстрат ковалентно связан с планшетом, таких артефактов, как pH-зависимое вытеснение биотинилированного субстрата, не происходит. Чувствительность метода позволяет быстро измерять гиалуронидазную активность культивируемых клеток и биологических образцов с вариацией между анализами менее 10%.

Другие анализы для измерения активности гиалуронидазы также известны в уровне техники и могут быть использованы в методах по настоящему изобретению (см., например, Delpach и др., (1995) *Anal. Biochem.* 229:35-41; Takahashi и др., (2003) *Anal. Biochem.* 322:257-263).

Многие анализы на гиалуронидазную активность основаны на образовании новых восстанавливающих N-ацетиламиновых групп (Bonner и Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13: 746-752, 1966), потере вязкости (De Salegui и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 548-554, 1967) или мутности (Dorfman и Ott, *J. Biol. Chem.* 172: 367, 1948). При наличии очищенного субстрата все указанные способы подходят для определения наличия или отсутствия эндогликозамидазной активности.

Существенно очищенные гликозаминогликановые субстраты также могут быть использованы в анализе на изменение подвижности в геле. Для определения эндогликозидазной активности гликозаминогликаны смешивают с рекомбинантным PH20, таким как растворимый PH20, что приводит к сдвигу подвижности субстрата внутри геля. Примеры таких субстратов включают, но не ограничиваются хондроитин-4-сульфатом и хондроитин-6-сульфатом, дерматансульфатом и гепарансульфатом, которые могут быть получены от Sigma Chemical. Гиалуроновая кислота из пуповины человека может быть получена от ICN. Например, каждый субстрат для исследования может быть разбавлен до концентрации приблизительно 0,1 мг/мл в буфере с pH 3,5 -7,5. Для анализа, например, приблизительно 10 мкл образца очищенного растворимого PH20 или кондиционированной среды от экспрессирующих PH20 клеток можно смешать с приблизительно 90 мкл субстрата в нужном буфере и инкубировать в течение 3 часов при 37°C. После инкубации образцы нейтрализуют буфером для образцов (Трис-ЭДТА, pH 8,0, бромфеноловый синий и глицерин), а затем исследуют с помощью электрофореза. Гликозаминогликаны могут быть обнаружены любым методом, известным в уровне техники, например, гликозаминогликаны можно обнаружить с помощью окрашивания гелей 0,5% альциановым синим в 3% ледяной уксусной кислоте в течение ночи с последующим отмыванием в 7% ледяной уксусной кислоте. Дегградацию гиалуронана определяют путем сравнения подвижности субстрата в присутствии и в отсутствие фермента.

Гиалуронидазную активность можно определить также с помощью гелевой зимографии в присутствии субстрата (Guentenhoner и др., 1992, *Matrix* 388-396). В данном анализе образец наносят на гель для SDS-PAGE, содержащий гиалуроновую кислоту, и белки в образце разделяют электрофорезом. Гель инкубируют в буфере для проведения ферментативной реакции, а затем окрашивают для выявления гиалуроновой кислоты в геле. Гиалуронидазная активность визуализируется как очищенная от субстрата зона геля.

Также может быть оценена способность растворимого полипептида PH20 действовать в качестве агента для распространения или диффузии. Например, краситель трипановый синий можно вводить мышам без волосяного покрова под кожу латеральной поверхности тела с каждой стороны с PH20 или без него. Затем для определения способности деградирующего гиалуронан фермента действовать в качестве агента для распространения может быть измерена область распространения красителя, например, с помощью микроциркуля (патент США № 20060104968). Эффект совместного введения гиалуронидазы с другим агентом, таким как терапевтический агент, на фармакокинетические и фармакодинамические свойства агента также может быть оценен *in vivo* на моделях на животных и/или человеческих субъектах, например, в серии клинических испытаний.

Функциональную активность растворимого полипептида PH20, такого как esPH20, можно сравнить и/или нормализовать на активность стандарта сравнения с использованием любого из этих методов. Это может быть сделано для определения функционально эквивалентного количества растворимого полипептида PH20. Например, способность растворимого PH20 действовать в качестве агента для распространения или диффузии может быть оценена путем введения его в кожу на боку мыши с трипановым синим, затем может быть определено количество, необходимое для достижения той же диффузии, как, например, при введении красителя со 100 единицами Стандарта сравнения гиалуронидазы. Количество растворимого полипептида PH20, таким образом, функционально эквивалентно 100 единицам гиалуронидазы.

2. Растворимость.

Растворимость гиалуронидазы может быть оценена любым известным специалисту в данной области методом. Одним из методов определения растворимости является анализ на распределение в растворе детергента. Например, растворимый полипептид PH20 можно отличить, например, по его свойству переходить в водную фазу раствора Тритон® X-114 при температуре 37°C (Bordier и др., (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1604-1607). Например, растворимость описанных в данном изобретении полипептидов PH20 оценивают, как описано в Примере 4. Заякоренные в мембране гиалуронидазы, такие как заякоренные липидами гиалуронидазы, в том числе GPI-заякоренные гиалуронидазы, переходят в богатую детергентом фазу, но переходят в бедную детергентом или водную фазу после обработки фосфолипазой C. Фос-

фолипаза С (PLC) является ферментом, который расщепляет фосфо-глицерольную связь в GPI-заякоренных белках. Обработка PLC вызовет высвобождение GPI-связанных белков от внешней мембраны клетки.

Другим методом оценки растворимости является определение наличия у полипептида PH20 GPI-якоря. Полипептид PH20 с GPI-якорем связан с клеточной мембраной и, следовательно, не является растворимым. Чтобы определить, является ли полипептид PH20 GPI-заякоренным, можно оценить растворимость полипептида до и после гидролиза PLC/PLD, а также применить компьютерные алгоритмы для выявления сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря. Белки с GPI-якорем могут быть определены по солюбилизации после специфического ферментативного или химического расщепления в сочетании с распределением в растворе детергента (например, в растворе Тритон® X-114), по распознаванию антителами и с помощью метаболической радиоактивной метки.

Распространенным методом, используемым для выявления белков с GPI-якорем, является их отделение от клеточной поверхности или их солюбилизация при обработке препаратов бактериальной PI-PLC или GPI-специфической фосфолипазой С трипаносомы (GPI-PLC). Указанные ферменты расщепляют диацилглицерол в мембране и производят иммунореактивный гликановый эпитоп (CRD) в белке, который можно обнаружить методом Вестерн-блоттинг с антителами против GPI трипаносом. Общая проблема, связанная с этим подходом, особенно характерная для клеток млекопитающих, заключается в том, что липаза не расщепляет GPI якорь, в котором инозитол ацилирован. Для анализа требуется предварительная обработка разбавленной щелочью для удаления остатков жирных кислот от инозитольного кольца. Альтернативно, для расщепления GPI-якоря можно использовать полученную из сыворотки GPI-специфическую фосфолипазу D. Этот фермент расщепляет связь между инозитольным кольцом и фрагментом фосфатидной кислоты и не ингибируется ацилированием инозитола. Обработка плавиковой кислотой расщепляет связь между инозитольным кольцом и фрагментом фосфатидной кислоты, а также расщепляет фосфодиэфирные связи между любыми фосфоэтаноламинами и остатками маннозы. Обработка разведенной азотистой кислотой особенно полезна при изучении GPI-якорей, поскольку при такой обработке специфично расщепляется связь между неацетилованным глюкозамином и инозитольным кольцом, освобождая связанный с гликаном белок (содержащий маркерный ангидроманнозный фрагмент) и фосфатидинозитол. В сочетании с антителами к CRD, анализом химического состава, радиоактивным мечением миоинозитола, этаноламина, глюкозамина, маннозы или жирных кислот, хроматографическим анализом или анализом с распределением в растворе детергентов, указанные способы расщепления представляют собой мощный набор инструментов для изучения GPI-якорей белков.

Для идентификации консенсусной сигнальной последовательности присоединения GPI-якоря в полипептидах были разработаны различные *in silico* методы и алгоритмы (см., например, Udenfriend и др., (1995) *Methods Enzymol.* 250:571-582; Eisenhaber и др., (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 и др., (2005) *Bioinformatics* 21:1846-1852; Omaetxebarria и др., (2007) *Proteomics* 7:1951-1960; Pierleoni и др., (2008) *BMC Bioinformatics* 9:392); включая алгоритмы, легко доступные на биоинформатических веб-сайтах, таких как вебсайт ExPASy Proteomics tools (вебсайт expasy.cn/tools/). Таким образом, специалист в данной области может определить, содержит ли полипептид PH20 сигнальную последовательность присоединения GPI-якоря, и, следовательно, является ли полипептид PH20 белком с GPI-якорем.

Г. Примеры.

Следующие примеры приведены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Получение укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20.

Получена серия укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20. Зрелая человеческая гиалуронидаза PH20 или молекула адгезии сперматозоидов 1 (SPAM1) содержит 474 аминокислоты, в то время как получаемый по этому примеру зрелый укороченный с С-конца мутант включает в длину от 472 до 415 аминокислот.

ДНК-олигонуклеотиды, кодирующие усеченные с аминокислоты A507 до аминокислоты K450 с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20, были синтезированы в соответствии со стандартными протоколами синтеза ДНК. Исходная последовательность ДНК представляла собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность человеческой гиалуронидазы PH20, приведенную в SEQ ID NO: 2. Указанная последовательность человеческой гиалуронидазы PH20 с оптимизированными кодонами содержала гетерологичную сигнальную последовательность иммуноглобулина каппа (IGK), приведенную в SEQ ID NO: 144.

Кроме того, для клонирования в плазмиду HZ24 последовательности содержали 5' NheI и 3' BamHI сайты рестрикции (SEQ ID NO: 140). Нуклеотидные последовательности укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20 приведены в SEQ ID NOS: 146-185 и 199-201. Для получения индивидуальных клонов содержащих мутанта плазмид SPAM1-HZ24 синтетические последовательности ДНК расщепляли эндонуклеазами рестрикции NheI и BamHI и клонировали в расщепленную теми же ферментами плазмиду HZ24.

Укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 приведены в табл. 3. Мутанты SPAM1 идентифицировали по 4 аминокислотам на С-конце белка. В таблице также приведены длины (в аминокислотах) предшественников и зрелых укороченных с С-конца мутантов.

Таблица 3. Укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20

Мутант	Предшественник (аминокислоты)	Предшественник SEQ ID NO	Зрелый пептид (аминокислоты)	Зрелый пептид SEQ ID NO
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
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

Пример 2. Экспрессия укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20.

Сконструированные в Примере 1 укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 экспрессировали в клетках CHO-S. Кроме того, gHuPH20 и PH20 с His-метками экспрессировали в каждом из четырех штаммов устойчивых к лектину мутантов CHO, включая Lec1 (№ CRL-1735, ATCC), Lec2 (№ CRL-1736, ATCC), Lec8 (№ CRL-1737, ATCC) и Pro-5 (№ CRL-1781). Экспрессия PH20 в мутантных клетках Lec более подробно описана в Примере 9 ниже.

А. Временная экспрессия в клетках CHO-S в 6-луночных планшетах.

Сконструированные в Примере 1 плазмиды PH20-HZ24, содержащие мутантный ген, временно трансфицировали в клетки CHO-S (производные клеток яичников китайского хомячка CHO K1) с помощью GeneJuice® (Novagen) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки CHO-S культивировали в CD CHO среде, дополненной L-глутамином. До трансфекции CHO-S клетки высевали на 6-луночные планшеты при плотности приблизительно 5×10^5 клеток на лунку и выращивали в течение ночи при температуре 37°C и 5% CO₂. Среду удаляли и CHO-S клетки промывали 2 раза 1 мл бессывороточной среды. GeneJuice® смешивали с бессывороточной средой с последующим добавлением 2 мкг ДНК мутантной HZ24. После инкубации при комнатной температуре в течение 5-15 мин смесь GeneJuice®/ДНК добавляли по каплям в лунки, содержащие отмытые CHO-S клетки. Через 4 часа среду заменяли на 1 мл CD-CHO среды, дополненной L-глутамином, и клетки инкубировали в течение 72 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. После экспрессии среду и клетки собирали отдельно. В. Транзиентная экспрессия в клетках CHO в 10 см культуральных чашках

Сконструированные в Примере 1 плазмиды PH20-HZ24, содержащие мутантный ген, временно трансфицировали в клетки CHO-S с помощью GeneJuice® (Novagen) в соответствии с инструкциями производителя. Кроме того, HZ24-PH20 (SEQ ID NO: 108, кодирующая gHuPH20), PH20 His, (SEQ ID NO: 187, кодирующая PH20 с His-меткой) и HZ24-Mut (B/S) (SEQ ID NO: 122, кодирующая укороченную до аминокислоты 482 PH20) временно трансфицировали в четыре штамма устойчивых к лектину мутантов CHO, включая Lec1 (№ CRL-1735, ATCC), Lec2 (№ CRL-1736, ATCC), Lec8 (№ CRL-1737, ATCC) и Pro-5 (№ CRL-1781), используя GeneJuice® (Novagen) в соответствии с инструкциями производителя.

Клетки CHO-S культивировали на CD-CHO среде, дополненной 8 mM GlutaMax. Устойчивые к лектину мутанты клеток CHO выращивали в среде DMEM с добавлением 10% ФБС. До трансфекции клетки CHO высевали в 10 см чашки для культивирования клеток при плотности 3×10^6 клеток на лунку и выращивали в течение ночи в среде DMEM с добавлением 10% ФБС при 37°C и 5% CO₂. Среду удаляли и монослой клеток промывали 2 раза 10 мл бессывороточной среды. 36 мкл GeneJuice® смешивали с 1,2 мл DMEM и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. После инкубации к смеси добавили 12 мкг ДНК и осторожно перемешали. После инкубации при комнатной температуре в течение 15 минут смесь GeneJuice®/ДНК по каплям добавляли к монослою клеток CHO, после чего культуральную чашку осторожно покачали для перемешивания содержимого. Чашку инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. Через 4 часа среду заменяли на 12 мл CD DG44 среды без детергента, дополненной Glutamax-1, и клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. После экспрессии отдельно собирали среду и клетки.

Пример 3. Растворимость укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20.

В этом примере после транзиентной экспрессии, описанной в Примере 2 выше, среду и клетки отдельно собирали и анализировали на экспрессию и растворимость PH20 с помощью Вестерн-блоттинг анализа. Растворимость укороченных с С-конца мутантов определяли по локализации экспрессированного белка в культуральной среде или в клетках. Укороченные с С-конца мутанты длиной от 455 до 472 аминокислот, приведенные в SEQ ID NO: 55-65 и 99-101, содержат аминокислотные остатки GPI-якоря, которые служат для прикрепления белка к клеточной мембране. Клетки, экспрессирующие такие мутанты, обрабатывали фосфоинозитол-фосфолипазой C (PI-PLC), которая расщепляет GPI-якорь, высвобождая растворимый белок в среду, затем наличие PH20 в полученной среде и клетках определяли методом Вестерн-блоттинг анализа.

А. Вестерн-блот анализ.

Не подвергнутые восстановлению образцы разделяли в 4-20% Трис-глициновом геле и переносили на PVDF мембрану с помощью iBlot (Invitrogen). Для иммуноблоттинга в качестве первичных антител использовали кроличьи анти-PH20 IgG (0,5 мкг/мл), в качестве вторичных антител использовали HRP-конъюгаты козьих антител против IgG кролика (0,1 нг/мл, # DC03L, EMD). Наличие экспрессии определяли по полосе, соответствующей приблизительно 66 кДа, что соответствует рекомбинантной человеческой гиалуронидазе PH20.

В. Обработка PI-PLC.

1. Транзиентная экспрессия в 6-луночных планшетах.

После экспрессии gHuPH20 в клетках CHO-S в течение 72 ч, как описано в Примере 2А выше, отдельно собирали среду и клетки. Клетки промывали бессывороточной средой, затем в каждую лунку добавляли по 2 мл бессывороточной среды. PI-PLC (0,5 ед/лунку) добавляли в каждую лунку, и клетки инкубировали с PI-PLC в течение 2 ч. Полученные среду и клетки анализировали с помощью Вестерн-блоттинг анализа, как описано выше.

2. Транзиентная экспрессия в 10 см культуральных чашках.

Для каждого укороченного с С-конца мутанта два планшета заполняли экспрессирующими gHuPH20 CHO-S клетками, как описано выше в Примере 2В, один планшет обрабатывали PI-PLC, а другой не обрабатывали PI-PLC. После экспрессии в течение 48 часов отдельно собирали не обработанные PI-PLC клетки и среду. Собранную среду центрифугировали, концентрировали до объема 10 мл, и буфер заменяли на PBS с помощью концентратора Amicon с пределом исключения по молекулярной массе

(MWCO) 30 кД. Клетки промывали холодным PBS, собирали и ресуспендировали в 1,2 мл PBS с ингибитором протеазы III (по каталогу № 539134, Calbiochem). Для получения цельноклеточного экстракта ресуспендированные клетки быстро обрабатывали ультразвуком. Для обработки клеток PI-PLC после экспрессии в течение 48 ч сначала, как описано выше, собирали необработанную среду. Клетки один раз промывали свежей средой CD DG44 с Glutamax-1, и среду заменяли на 12 мл свежей свободной от детергента среды CD DG44, дополненной Glutamax-1 с 3,0 единицами PI-PLC на чашку, затем клетки инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂. Через 2 часа среду с PI-PLC и клетки собирали отдельно, как описано выше. Полученные необработанную среду и клетки и обработанные PI-PLC среду и клетки анализировали методом Вестерн-блоттинг, как описано выше.

С. Результаты.

Результаты представлены в табл. 4 ниже. Четыре мутанта, ILFL (SEQ ID NO: 58), SILF (SEQ ID NO: 100), VSIL (SEQ ID NO: 59) и IVSI (SEQ ID NO: 101) характеризовались низкой экспрессией PH20. Анализ методом Вестерн-блоттинг показал, что укороченные с С-конца, по меньшей мере, до F500 мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 (SEQ ID NOS: 59-95 и 100-101) экспрессируются в среду, о чем свидетельствует полоса, соответствующая белку с массой приблизительно 66 кДа. Укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20, заканчивающиеся между L501 и A507 (SEQ ID NO: 55-58 и 99), экспрессируются и накапливаются в клетках. После обработки клеток PI-PLC человеческая гиалуронидаза PH20 секретируется в среду, о чем свидетельствует полоса, соответствующая белку с массой приблизительно 66 кДа. Обработка PI-PLC клеток, экспрессирующих укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20, соответствующие SEQ ID NO: 59-65 и 100-101, не оказывает никакого эффекта, так как эти белки первоначально экспрессируются в среду.

Таблица 4. Экспрессия укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20

Мутант	Зрелый белок (аминокислот)	Экспрессия белка	Экспрессия в среду	Экспрессия в среду после обработки PI-PLC
SPAM1-VASL (SEQ ID NO:108)	474	да	нет	да
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	472	да	нет	да
SPAM1-IISL (SEQ ID NO:56)	470	да	нет	да
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	468	да	нет	да
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO:99)	467	да	нет	да
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	466	слабая	нет	да
SPAM1-SILF (SEQ ID NO:100)	465	слабая	слабая/да	первоначально в среду
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	464	слабая	да	первоначально в среду
SPAM1-IVSI (SEQ ID NO:101)	463	слабая	да	первоначально в среду
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	462	да	да	первоначально в среду
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	460	да	да	первоначально в среду
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	458	да	да	первоначально в среду
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	456	да	да	первоначально в среду
SPAM1-STLS (SEQ ID NO:65)	455	да	да	первоначально в среду
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	454	да	да	первоначально в среду
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	452	да	да	нет данных
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO:67)	450	да	да	нет данных
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO:68)	449	да	да	нет данных
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO:69)	448	да	да	нет данных
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO:70)	447	да	да	нет данных
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO:71)	446	да	да	нет данных
SPAM1-EPQI (SEQ ID NO:72)	445	да	да	нет данных
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO:73)	444	да	да	нет данных

SPAM1-TEEP (SEQ ID NO:74)	443	да	да	нет данных
SPAM1-ETEE (SEQ ID NO:75)	442	да	да	нет данных
SPAM1-METE (SEQ ID NO:76)	441	да	да	нет данных
SPAM1-PMET (SEQ ID NO:77)	440	да	да	нет данных
SPAM1-PPME (SEQ ID NO:78)	439	да	да	нет данных
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO:79)	438	да	да	нет данных
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO:80)	437	да	да	нет данных
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO:81)	436	да	да	нет данных
SPAM1-AFLK (SEQ ID NO:82)	435	да	да	нет данных
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO:83)	434	да	да	нет данных
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO:84)	433	да	да	нет данных
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO:85)	432	да	да	нет данных
SPAM1-VCID (SEQ ID NO:86)	431	да	да	нет данных
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO:87)	430	да	да	нет данных
SPAM1-DGVC (SEQ ID NO:88)	429	да	да	нет данных
SPAM1-IADG (SEQ ID NO:89)	427	да	да	нет данных
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO:90)	425	да	да	нет данных
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO:91)	423	да	да	нет данных
SPAM1-DAVD (SEQ ID NO:92)	421	да	да	нет данных
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO:93)	419	да	да	нет данных
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO:94)	417	да	да	нет данных
SPAM1-ADVK (SEQ ID NO:95)	415	да	да	нет данных

Пример 4. Анализ растворимости укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20 с помощью Тритон® X-114.

В этом примере, растворимость укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20 оценивали с помощью анализа с Тритон® X-114. В данном анализе растворимая гиалуронидаза PH20 переходит в водную фазу раствора Тритон® X-114, нагретого до 37°C (модификация метода, как описано Bordier и др., (1981) J. Biol. Chem., 256:1604-7), тогда как заякоренная в мембране гиалуронидаза PH20 переходит в богатую детергентом фазу.

Для проведения анализа к 200 мкл культуральной среды или клеточного экстракта, полученного, как описано в Примере 3В выше, добавляли 2% (объем/объем) раствора Тритон® X-114 в PBS при 0°C, и образцы инкубировали на льду. Для разделения в пробирке для микроцентрифугирования образец наносили на 30 мкл сахарозной подложки (6% масса/объем), содержащей 0,06% Тритон® X-114 при температуре 4°C. Для разделения фаз образцы нагревали до 37°C в течение 3 мин и центрифугировали в течение 3 мин при 4000g при комнатной температуре. Водную и богатую детергентом фазы отбирали для анализа методом SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг. В качестве первичных антител использовали кроличьи анти-PH20 IgG (0,5 мкг/мл), в качестве вторичных антител использовали HRP-конъюгаты козьих антител против IgG кролика (0,1 нг/мл, # DC03L, EMD). Полноразмерную человеческую PH20, которая распределяется преимущественно в богатую детергентом фазу, использовали в качестве контроля.

Результаты анализа растворимости укороченных с С-конца мутантов приведены в табл. 5. Укороченные не менее чем до F500 с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 (предшественники приведены в SEQ ID NO: 7-13 и 48-49 и зрелые пептиды приведены в ID SEQ NO: 59-65 и 100-101) переходят в водную фазу и, следовательно, являются растворимыми. Укороченные не более чем до F500 с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 (SEQ ID NOS: 55-58 и 99) переходят в богатую детергентом фазу и не являются растворимыми. Полноразмерные PH20 также нерастворимы.

Таблица 5. Растворимость укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20

Мутант	SEQ ID NO	Зрелый пептид (аминокислот)	Растворимость
SPAM1-VASL	108	474	нет
SPAM1-SSVA	55	472	нет
SPAM1-ISS	56	470	нет
SPAM1-FLII	57	468	нет
SPAM1-LFLI	99	467	нет
SPAM1-ILFL	58	466	нет
SPAM1-SILF	100	465	да
SPAM1-VSIL	59	464	да
SPAM1-IVSI	101	463	да
SPAM1-FIVS	60	462	да
SPAM1-TMFI	61	460	да
SPAM1-SATM	62	458	да
SPAM1-TLSA	63	456	да
SPAM1-PSTL	64	454	да
SPAM1-STLS	65	455	да

Пример 5. Гиалуронидазная активность укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20.

Гиалуронидазную активность укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20 оценивали с применением микротитровального анализа с биотинилированной гиалуроновой кислотой (биотинилированная ГК или бГК). Гиалуронидазную активность укороченных с С-конца мутантов человеческой гиалуронидазы PH20 исследовали при pH 7,4 и pH 5,5.

В 4 × ВНХ 96-луночный планшет сорбировали биотинилированную ГК (1,1 МДа). Через 72 ч после трансфекции супернатант от клеток, трансфицированных укороченным с С-конца мутантом человеческой гиалуронидазы PH20, разводили в буфере с pH 7,4 или pH 5,5 и добавляли в отдельные лунки планшета, после чего инкубировали при 37°C в течение 90 мин. Реакцию останавливали добавлением 4М гуанидин-HCl. Для удаления расщепленной биотинилированной ГК лунки промывали 4 раза солевым фосфатным буферным раствором с Tween20 (PBST), затем в лунки добавляли стрептавидин-HRP и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки промывали 4 раза PBST, и планшет обрабатывали ТМВ. Оптическую плотность раствора в лунках планшета определяли при 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра для ИФА. Гиалуронидазную активность (в ед/мл) определяли путем интерполяции измеренного поглощения при 450 нм со стандартной кривой, полученной с использованием стандартного препарата гиалуронидазы. Полноразмерную зрелую человеческую гиалуронидазу PH20 и нетрансфицированные клетки СНО использовали в качестве положительного и отрицательного контроля.

Результаты представлены в табл. 6 и 6А ниже. Укороченные с С-конца до I430 или более мутанты человеческой гиалуронидазы PH20, соответствующие вариантам от SPAM1-GDVC до SPAM1-ADVК (SEQ ID NOS: 88-95), являются неактивными. Укороченные с С-конца до I498 (SEQ ID NO: 101), L499 (SEQ ID NO: 59), F500 (SEQ ID NO: 100), L501 (SEQ ID NO: 58) и I502 (SEQ ID NO: 99) мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 обладают трудно обнаруживаемой активностью из-за низкого уровня экспрессии. Все остальные укороченные с С-конца мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 (SEQ ID NOS: 55-57 и 60-87) проявляют гиалуронидазную активность при pH 7,4 и pH 5,5.

Таблица 6. Гиалуронидазная активность

Мутант с делецией	Предшественник (аминокислот)	Зревший белок (аминокислот)	Активность при pH 7,4 (ед./мл)	Активность при pH 5,5 (ед./мл)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	507	472	1,4715	1,125
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	505	470	1,458	0,837
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	503	468	0,9405	0,6345
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	501	466	0,0405	0,0405
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	499	464	0,02025	0,045
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	497	462	0,1755	0,216
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	495	460	0,45	0,612
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	493	458	0,5715	0,7335
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	491	456	0,3645	0,5625
SPAM1-STLS (SEQ ID NO:65)	490	455	0,819	1,2375
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	489	454	1,557	1,089
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	487	452	1,017	0,9225
SPAM1-YNAS (SEQ ID NO:67)	485	450	1,8765	1,74825
SPAM1-FYNA (SEQ ID NO:68)	484	449	1,4985	1,26225
SPAM1-IFYN (SEQ ID NO:69)	483	448	2,45025	2,3085
SPAM1-QIFY (SEQ ID NO:70)	482	447	2,03175	1,647
SPAM1-PQIF (SEQ ID NO:71)	481	446	1,818	1,701
SPAM1-EPQI (SEQ ID NO:72)	480	445	2,1825	1,6425
SPAM1-EEPQ (SEQ ID NO:73)	479	444	1,917	2,0745
SPAM1-TEEP (SEQ ID NO:74)	478	443	1,764	1,584
SPAM1-ETEE (SEQ ID NO:75)	477	442	2,088	2,0475
SPAM1-METE (SEQ ID NO:76)	476	441	1,332	1,278
SPAM1-PMET (SEQ ID NO:77)	475	440	2,223	2,0925
SPAM1-PPME (SEQ ID NO:78)	474	439	1,2105	1,341
SPAM1-KPPM (SEQ ID NO:79)	473	438	0,8595	0,91575
SPAM1-LKPP (SEQ ID NO:80)	472	437	0,5445	0,9
SPAM1-FLKP (SEQ ID NO:81)	471	436	3,321	2,79
SPAM1-AFLK (SEQ ID NO:82)	470	435	3,204	2,925
SPAM1-DAFL (SEQ ID NO:83)	469	434	2,3895	2,2365
SPAM1-IDAF (SEQ ID NO:84)	468	433	0,5625	0,62775
SPAM1-CIDA (SEQ ID NO:85)	467	432	0,5535	0,4725
SPAM1-VCID (SEQ ID NO:86)	466	431	0	0,2115
SPAM1-GVCI (SEQ ID NO:87)	465	430	0,441	0,468
SPAM1-DGVC (SEQ ID NO:88)	464	429	0	0,045
SPAM1-IADG (SEQ ID NO:89)	462	427	0	0,00225
SPAM1-VCIA (SEQ ID NO:90)	460	425	0	0,0135
SPAM1-VDVC (SEQ ID NO:91)	458	423	0,0495	0,0585
SPAM1-DAVD (SEQ ID NO:92)	456	421	0	0,0675
SPAM1-DTDA (SEQ ID NO:93)	454	419	0	0,054
SPAM1-VKDT (SEQ ID NO:94)	452	417	0,054	0,0225
SPAM1-ADVК (SEQ ID NO:95)	450	415	0,063	0,0405
VASL (SEQ ID NO:108)	509	474	1,8045	0,891
VASL + PLC (SEQ ID NO:108)	509	474	3,96	2,313
HZ24-PH20 (SEQ ID NO:109)	482	447	0,499	0,726188
CHO-S	нет данных	нет данных	0	0,012375

Таблица 6А. Гиалуронидазная активность

Мутант с делецией	Предшественник (аминокислот)	Зревший белок (аминокислот)	Активность при pH 7,4 (ед./мл)	Активность при pH 5,5 (ед./мл)
SPAM1-SSVA (SEQ ID NO:55)	507	472	1,782	1,256
SPAM1-IISS (SEQ ID NO:56)	505	470	1,863	0,932
SPAM1-FLII (SEQ ID NO:57)	503	468	1,094	0,648
SPAM1-LFLI (SEQ ID NO:99)	502	467	0,608	0,324
SPAM1-ILFL (SEQ ID NO:58)	501	466	0,446	0,122
SPAM1-SILF (SEQ ID NO:100)	500	465	0,365	0,162
SPAM1-VSIL (SEQ ID NO:59)	499	464	0,486	0,122
SPAM1-IVSI (SEQ ID NO:101)	498	463	0,527	0,203
SPAM1-FIVS (SEQ ID NO:60)	497	462	0,365	0,162
SPAM1-TMFI (SEQ ID NO:61)	495	460	0,689	0,770
SPAM1-SATM (SEQ ID NO:62)	493	458	0,689	0,851
SPAM1-TLSA (SEQ ID NO:63)	491	456	0,851	0,729
SPAM1-PSTL (SEQ ID NO:64)	489	454	1,985	3,321
SPAM1-ASPS (SEQ ID NO:66)	487	452	1,134	1,580

Пример 6. Анализ гликана gHuPH20 с помощью LC-MS.

В этом примере с помощью масс-спектрального анализа расщепленного трипсином PH20 исследовали гликаны gHuPH20 (SEQ ID NO: 122).

gHuPH20 (полученный, как описано в Примере 15C) лиофилизировали и ресуспендировали в буфере, содержащем 6 М гуанидин-HCl, 0,002 М ЭДТА и 0,02 М Трис, с pH 8,28 до конечной концентрации 0,5 мг/мл. К раствору добавляли DTT (конечная концентрация 10 мМ) и смесь белок/DTT инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. После восстановления к раствору добавляли иодацетамид до конечной концентрации 20 мМ. Наконец, к раствору добавляли трипсин (1:25 по массе) и смесь инкубировали в течение 20 ч при температуре 37°C.

Расщепленный трипсином препарат анализировали методом LC-MS. Расщепленный трипсином препарат загружали на обратнофазную колонку C18, как описано в табл. 7 ниже. Данные анализа MS получали с помощью массспектрометра Q-TOF Ultima с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме положительно заряженных ионов. Данные получали для m/z 200 - 1950 в режиме MS. Для определения типа гликана гликопептиды анализировали с помощью программного обеспечения GlycoMod (www.expasy.ch/tools/glycomod/).

Таблица 7. Параметры и настройки LC-MS

Параметры	Настройки		
Колонка	Phenomenex Synergi Hydro-RP		
Температура колонки	30°C		
Подвижная фаза А	деионизированная вода, содержащая 0,2% муравьиной кислоты		
Подвижная фаза В	ацетонитрил, содержащий 0,2% муравьиной кислоты		
Градиент	время (мин)	%А	%В
	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
	161,0	97,0	3,0
	180,0	97,0	3,0
Скорость потока через колонку	0,2 мл/мин		
Объем нанесения	5 мкл		
Время разделения (общее)	180 минут		

Человеческая гиалуронидаза PH20 имеет один сайт О-гликозирования в положении T475. Сайт занимает коровий гликан 1 типа, включающий один или два остатка сиаловой кислоты. gHuPH20 гликозильирован по шести различным остаткам аспарагина, N82, N166, N235, N254, N368 и N393. Результаты исследования показывают, что положение N254 занято гликаном приблизительно в 75% случаев, N393 занято приблизительно в 85%, а четырех оставшихся положений, N82, N166, N235 и N368, заняты более чем в 99% случаев. В gHuPH20 присутствуют все три типа N-гликанов, то есть богатые маннозой, гибридные и сложные гликаны. Как правило, gHuPH20 содержит приблизительно 45% богатых маннозой гликанов, 45% сложных гликанов и 10% гибридных гликанов. Приблизительно 35% всех гликанов явля-

ются анионными, 25% из которых содержат сиаловую кислоту, а оставшиеся 10% содержат неизвестные анионные группы, возможно, фосфатные группы. Большая часть сложных гликанов фукозилированы, анионные сложные гликаны в основном содержат один остаток сиаловой кислоты, в то время как некоторые из них содержат два остатка сиаловой кислоты. Каждый остаток аспарагина замещен приблизительно в 90% случаев гликаном одного типа и редко гликанами двух других типов, за исключением N235. Основные типы гликанов для каждого остатка приведены в табл. 8 ниже. Остатки N82, N166 и N254 заняты сложными гликанами. Остатки N368 и N393 заняты богатыми маннозой гликанами. Остаток N235 занят приблизительно в 80% случаев богатыми маннозой гликанами и приблизительно в 20% случаев сложными гликанами.

Таблица 8. Типы N-гликанов аспарагиновых остатков гHuPH20

Сайт гликозилирования	Богатые маннозой гликаны	Сложные гликаны
N82		X
N166		X
N235	~ 80%	~ 20%
N254		X
N368	X	
N393	X	

Пример 7. Дегликозилирование человеческой гиалуронидазы PH20 с помощью обработки эндогликозидазой.

В этом примере человеческую гиалуронидазу PH20 дегликозилировали, обрабатывая очищенную гHuPH20 (SEQ ID NO: 122) различными гликозидазами и оценивая гиалуронидазную активность. Человеческая гиалуронидаза PH20 гликозилирована по шести различным остаткам аспарагина, N82, N166, N235, N254, N368, и N393. Для получения дегликозилированных человеческих гиалуронидаз PH20 применяли пять гликозидаз, включая ПНГазу F (New England Biolabs, номер по каталогу P0704S, лот #34), которая расщепляет все N-гликаны; EndoF1, которая расщепляет богатые маннозой и гибридные гликаны; EndoF2, которая расщепляет биантенные сложные гликаны; EndoF3, которая расщепляет биантенные и более разветвленные сложные гликаны, и EndoH (New England Biolabs, номер по каталогу P0702S), которая расщепляет богатые маннозой и гибридные гликаны. Таким образом, обработка ПНГазой F приводит к полному дегликозилированию пептида, в то время как обработка эндогликозидазами приводит к лишь частичному дегликозилированию.

Для полного дегликозилирования очищенную гHuPH20 (конечная концентрация 0,1 мг/мл) инкубировали с ПНГазой F (50000 ед/мл) в 50 мМ фосфатном буфере с pH 7,2 в течение ночи при температуре 37°C. Для частичного дегликозилирования очищенную гHuPH20 (конечная концентрация 0,5 мг/мл) инкубировали с 0,3 ед/мл эндогликозидазы (EndoF1, EndoF2, EndoF3 или EndoH) или смесью всех четырех эндогликозидаз в 50 мМ натрий-ацетатном буфере с pH 5,0 в течение ночи при 35°C. Дегликозилирование гHuPH20 оценивали по изменению подвижности PH20 в SDS-PAGE. Ферментативную активность гиалуронидазы определяли, как описано в Примере 5.

Молекулярная масса человеческой гиалуронидазы PH20 составляет приблизительно 66 кДа. Обработка EndoF1, EndoH или смесью EndoF1, EndoF2, EndoF3 и EndoH привела к частичному дегликозилированию человеческой гиалуронидазы PH20, которое оценивали по изменению подвижности белка в SDS-PAGE до кажущейся молекулярной массы приблизительно 56 кДа. Обработка ПНГазой F привела к полному дегликозилированию человеческой гиалуронидазы PH20. Частичное дегликозилирование гHuPH20 не привело к инактивации гиалуронидазы, в то время как полное расщепление ПНГазой F, полностью удаляющее N-гликаны, привело к полной потере ферментативной гиалуронидазной активности (см. табл. 9 ниже).

Таблица 9. Эффект обработки гликозидазой на активность гHuPH20

гHuPH20 (ед/мл)	контроль PH20	EndoF1	EndoF2	EndoF3	EndoH	EndoF1,F2,F3,H	ПНГазаF
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

Пример 8. Обработка человеческой гиалуронидазы PH20 ингибиторами гликозилирования.

гHuPH20 (SEQ ID NO: 122) временно экспрессировали в присутствии каждого из двух ингибиторов гликозилирования, после чего оценивали секрецию и активность гиалуронидазы. Кифунензин является

мощным ингибитором участвующего в процессинге гликанов фермента маннозидазы I (см., например, Elbein и др., J Biol Chem, 265: 15599-15605 (1990)). Туникамицин представляет собой смесь гомологичных нуклеозидных антибиотиков, которые ингибируют фермент GlcNAc-фосфотрансферазу (GPT), тем самым блокируя синтез всех N-гликанов (см., например, Böhme et al., Eur. J. Biochem. 269:977-988 (2002)).

1×10^6 HZ24-2B2 экспрессирующих gHuPH20 клеток (см. Пример 14 ниже) высевали в 24 мл полной CD-CHO среды в два 125 мл флакона. Туникамицин (растворенный в ДМСО) или кифунензин (свежий водный раствор) добавляли до конечной концентрации 5 мкг/мл (содержание ДМСО 12 мкл). В качестве контроля в один флакон высевали 1×10^6 HZ24-2B2 клеток, экспрессирующих gHuPH20, и к содержимому добавляли 12 мкл ДМСО. После добавления туникамицина или кифунензина клетки инкубировали в течение 4-6 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. После экспрессии 2 мл культуральной среды отбирали и центрифугировали в течение 5 мин при 500g. Супернатант хранили при температуре 4°C, клеточный осадок хранили при температуре -20°C. Оставшиеся 22 мл культуры центрифугировали в течение 5 мин при 500g. Супернатант хранили при 4°C. Клетки ресуспендировали в 22 мл полной CD-CHO среды в двух исходных 125 мл флаконах. Туникамицин или кифунензин добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Приблизительно через каждые 24 ч после замены среды из каждой колбы отбирали два мл (2 мл) культуры. Для каждой временной точки супернатант хранили при температуре 4°C, а клеточный осадок при температуре -20°C. Экспрессию gHuPH20 анализировали методом Вестерн-блоттинг, а гиалуронидазную активность измеряли с помощью анализа с биотинилированной ГК (как описано в Примерах 3 и 5 выше).

Результаты представлены в табл. 10-13 ниже, где приведены количество жизнеспособных клеток и активность PH20. Как показано в табл. 10-11, туникамицин ингибирует активность PH20 в культуральной среде и внутри клеток, а также приводит к полной потере жизнеспособности клеток. Кроме того, один час обработки туникамицином приводит к накоплению дегликозилированной человеческой гиалуронидазы PH20 внутри клеток, определенному по изменению подвижности белка из фракций клеточного осадка в SDS-PAGE до кажущейся молекулярной массы приблизительно 56 кДа. Как показано в табл. 12-13, кифунензин не влияет на активность PH20, в то время как анализ методом Вестерн блоттинг показал, что кифунензин тормозит экспрессию и секрецию gHuPH20 в обработанных им клетках.

Таблица 10. Влияние туникамицина на жизнеспособность клеток и активность PH20 в культуральной среде

Время (часы)	В присутствии туникамицина		Без туникамицина	
	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)
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

Таблица 11. Влияние туникамицина на жизнеспособность клеток и активность PH20 в клеточном осадке

Время (часы)	В присутствии туникамицина		Без туникамицина	
	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)
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

Таблица 12. Влияние кифунензина на жизнеспособность клеток и активность PH20 в культуральной среде

Время (часы)	В присутствии кифунензина		Без кифунензина	
	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)
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

Таблица 13. Влияние кифунензина на жизнеспособность клеток и активность PH20 в клеточном осадке

Время (часы)	В присутствии кифунензина		Без кифунензина	
	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)	жизнеспособные клетки ($\times 10^6$)	Активность PH20 (ед/мл)
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

Пример 9. Транзистентная экспрессия gHuPH20 в устойчивых к лектину мутантах CHO.

gHuPH20 временно экспрессировали в четырех устойчивых к лектину мутантах CHO и оценивали секрецию и активность гиалуронидазы. Характеристики устойчивых к лектину мутантов CHO приведены в табл. 14 ниже. В клетках Pro⁻⁵ отсутствует галактозилтрансфераза $\beta 4\text{galT-6}$, что приводит к уменьшению количества галактозилированных N-гликанов (см., например, Lee и др., J. Biol. Chem. 276: 13924-13934 (2001)). В клетках Lec1 отсутствует активность N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I, и, следовательно, клетки не синтезируют сложные или гибридные гликаны (см., например, Chen и Stanley, Glycobiology, 13:43-50 (2003)). В клетках Lec2 и Lec8 отсутствуют переносчики сахаронуклеотидов, которые переносят сахаронуклеотиды через мембрану ЭР или аппарата Гольджи. Клетки Lec2 не способны к транслокации CMP-сиаловой кислоты (а именно CMP-NeuAc), поэтому на поверхности клетки экспрессируются асиалированные белки (см., например, Eckhardt et al., J. Biol. Chem. 273:20189-20195 (1998)). Клетки Lec8 не способны к транслокации UDP-галактозы, поэтому в гликанах этих клеток отсутствует галактоза (см., например, Bakker et al., Glycobiology, 15:193-201 (2005)).

Таблица 14. устойчивые к лектину мутанты CHO

Линия клеток CHO	Биохимическое изменение	Генетическое изменение
Pro ⁻⁵	↓ Gal в N-гликанах	Нет экспрессии <i>$\beta 4\text{galT6}$</i>
Lec1	↓ GlcNAc-T I	вставка/делеция в OPC <i>Mgat1</i>
Lec2	↓ транспортер CMP-сиаловой кислоты в мембране аппарата Гольджи	Мутация в OPC <i>Slc35a1</i>
Lec8	↓ UDP-Gal транспортер в мембране аппарата Гольджи	Мутация в OPC <i>Slc35a2</i>

PH20 His (PH20 с His-меткой, SEQ ID NO: 187) транзистентно экспрессировали в каждом из четырех штаммов устойчивых к лектину мутантов CHO, Lec1 (№ CRL-1735, ATCC), Lec2 (№ CRL-1736, ATCC), Lec8 (№ CRL-1737, ATCC) и Pro⁻⁵ (№ CRL-1781), как описано в Примере 2А выше. Кроме того, в клетках Pro⁻⁵ транзистентно экспрессировали HZ24-Mut(B/S) (плазмида кодирует укороченный до 482 аминокислоты PH20, SEQ ID NO: 122), и в качестве отрицательного контроля Pro⁻⁵ клетки подвергали процедуре трансфекции без плазмиды. Полученную культуральную среду анализировали методом Вестерн-блоттинг, гиалуронидазную активность измеряли с помощью анализа с биотинилированной ГК (как описано в Примерах 3 и 5 выше).

Результаты показывают, что экспрессируемые в Lec мутантах gHuPH20 секретируются в среду, о чем свидетельствует полоса, соответствующая белку с массой приблизительно 66 кДа. Результаты анали-

за ферментативной активности с бГК приведены в табл. 15 ниже, где указаны устойчивые к лектину мутанты CHO, используемые для трансфекции клеток кодирующие PH20 плазмиды и активности PH20 при pH 5,5 для разведений 1 : 27 и 1 : 81. Экспрессированный в Lec мутантных клетках gHuPH20 является ферментативно активным.

Таблица 15. Активность PH20 (ед/мл) транзистентно экспрессированной в Lec мутантных клетках gHuPH20.

Устойчивый к лектину мутант	Pro-5	Pro-5	Lec1	Lec2	Lec8	Pro-5
Плазмиды	HZ24-mut(B/S)	HZ24-PH20 His	HZ24-PH20 His	HZ24-PH20 His	HZ24-PH20 His	Трансфекция без плазмиды
Активность PH20 (1:27)	0,6615	0,297	0,54	0,675	0,2565	0,081
Активность PH20 (1:81)	1,1745	0,6075	0,7695	1,053	0,567	0,1215

Пример 10. Сайт-направленный мутагенез сайтов N-гликозилирования в человеческой гиалуронидазе PH20.

Получены дегликозилированные сайт-специфические мутанты человеческой гиалуронидазы PH20 по сайтам N-гликозилирования и были оценены их паттерны секреции и ферментативная гиалуронидазная активность. Дегликозилированные сайт-специфические мутанты по сайтам N-гликозилирования и типы их гликанов описаны в табл. 16 ниже.

В качестве матрицы для мутагенеза каждого остатка аспарагина на аланин использовали PH20 His (SEQ ID NO: 210) и применяли набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange® (номер по каталогу 200518, Stratagene). Кодированный ДНК-матрицей белок соответствует PH20 His (SEQ ID NO: 187), клону человеческой PH20, который содержит гексагистидиновую метку (SEQ ID NO: 142) после аминокислоты S490. PH20 His дикого типа и дегликозилированные мутанты приведены в табл. 16. Были получены шесть вариантов с одной мутацией, по одному для каждого сайта N-гликозилирования. Кроме того, для аспарагинов N82, N166 и N254, каждый из которых замещен сложным гликаном, было создано три двойных мутантов и тройной мутант. Наконец, был получен двойной мутант N368A/N393A, в котором отсутствуют богатые маннозой гликаны. Мутанты трансфицировали в CHO-S клетки и белки экспрессировали, как описано в Примере 2A. Секрецию в среду и гиалуронидазную активность определяли, как описано в Примерах 3 и 5 выше.

Результаты представлены в табл. 16 ниже, в которой указаны мутации, типы гликанов, наличие секреции белка в среду и гиалуронидазная активность при pH 5,5 и pH 7,4. Вестерн-блоттинг анализ показал, что мутация остатков N82, N166, N235 и N254 не влияет на секрецию белка gHuPH20 в среду. Мутация остатков N368A и N368A/N393A предотвращает экспрессию и секрецию PH20, о чем свидетельствует отсутствие белка с молекулярной массой приблизительно 66 кДа в среде. Мутация остатка N393A приводит к снижению экспрессии белка, но gHuPH20 обнаруживается в среде, о чем свидетельствует полоса, соответствующая белку с массой приблизительно 66 кДа. Мутация остатков N82, N166 и/или N254 не влияет на активность gHuPH20. Эти остатки заняты сложными гликанами. Напротив, мутация остатков N235, N368 и/или N393, которые содержат богатые маннозой гликаны, приводит к полной потере обнаруживаемой активности в среде из-за отсутствия секреции.

Таблица 16. Дегликозилированные мутанты человеческой гиалуронидазы PH20

мутант	SEQ ID NO	Тип гликана	Секреция	Активность при pH 5,5	Активность при pH 7,4
PH20 His (исходный)	187	оба типа	да	да	да
N82A	202	сложный	да	да	да
N166A	203	сложный	да	да	да
N235A	204	богатый маннозой (80%) сложный (20%)	да	нет	нет
N254A	205	сложный	да	да	да
N368A	188	богатый маннозой	нет	нет	нет
N393A	189	богатый маннозой	да (слабая)	нет	нет
N82A/N166A	206	сложный	да	да	да
N82A/N254A	207	сложный	да	да	да
N166A/N254A	208	сложный	да	да	да
N82A/N166A/N254A	209	сложный	да	да	да
N368A/N393A	190	богатый маннозой	нет	нет	нет

Для визуализации экспрессии дегликозилированных сайт-специфических мутантов по сайтам N-гликозилирования N368A, N393A и N368A/N393A использовали иммунофлуоресцентный анализ клеток CHO с анти-PH20 антителами. Для получения монослойной культуры клетки CHO высевали в 8-луночные камеры для микроскопирования по 200 мкл клеток с концентрацией $2,5 \times 10^4$ клеток на миллилитр модифицированной Дульбеко среды Игла (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), и выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки трансфицировали через 36 ч при плотности монослоя 80% с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) следующим образом. ДНК (0,4 мкг в 50 мкл DMEM без сыворотки) и Lipofectamine™ 2000 (1 мкл в DMEM без сыворотки) осторожно смешивали в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем добавляли в каждую лунку, содержащую клетки и 100 мкл бессывороточной среды. Перемешивание производили осторожно, покачивая планшет назад и вперед. Затем клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 4-6 ч, после чего бессывороточную среду заменяли на содержащую 10% FBS среду. Через 48 ч после трансфекции клетки в камерах для микроскопирования фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин. Клетки промывали 3 раза PBS, к ним добавляли 200 мкл 1% раствора NP-40/PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза PBS и хранили при 4°C до окрашивания антителами.

Для окрашивания антителами клетки образцы блокировали 15% нормальной козьей сывороткой в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки инкубировали в течение 2 ч с 1 : 20 раствором анти-PH20 IgG кролика, разведенным 5% нормальной козьей сывороткой в PBS. Наконец, клетки отмывали 3 раза PBS, затем в течение 1 ч инкубировали с FITC-конъюгированными козьими антителами к IgG кролика для последующей визуализации. Кроме того, раствор для фиксации содержал DAPI для окрашивания ядер. Иммунофлуоресцентный анализ с применением анти-PH20 антител показал, что мутации N368A и N393A вызывают накопление PH20 внутри клеток.

Выводы из исследований N-гликозилирования.

Как продемонстрировано в Примерах 7-10 выше, N-гликозилирование является необходимым для фолдинга и ферментативной активности gHuPH20. Полное дегликозилирование gHuPH20, достигаемое исчерпывающим расщеплением ПНГазой F или ингибированием гликозилирования туникамицином в процессе биосинтеза, приводит к потере ферментативной активности. Кроме того, было показано накопление негликозилированного gHuPH20 в клетке. Напротив, частично дегликозилированная gHuPH20, получаемая обработкой кифунензином или экспрессией в Лес мутантах, сохраняет ферментативную активность. Наконец, детальный мутационный анализ с помощью сайт-направленного мутагенеза показал, что наличие богатых маннозой гликанов необходимо для получения растворимой, ферментативно активной gHuPH20.

Пример 11. Получение клеточной линии, экспрессирующей растворимую gHuPH20.

Плазмиду HZ24 (приведенную в SEQ ID NO: 140) использовали для трансфекции клеток яичника китайского хомячка (CHO клеток) (см., например, заявки США №№ 10,795,095, 11/065,716 и 11/238,171). Плазмидный вектор HZ24 для экспрессии растворимой gHuPH20 содержит основу вектора PCI (Promega), ДНК, кодирующую аминокислоты 1-482 человеческой гиалуронидазы PH20 (SEQ ID NO: 110), внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) вируса ECMV (Clontech) и ген дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR). Вектор PCI также включает в себя ДНК, кодирующую ген бета-лактамазы (AmpR), точку начала репликации fl, немедленный ранний энхансерный/промоторный район цитомегаловируса (CMV), химерный интрон и поздний сигнал полиаденилирования вируса SV40 (SV40). Конструкция ДНК, кодирующая растворимую gHuPH20, содержит сайт NheI и консенсусную последовательность Козака до последовательности ДНК, кодирующей метионин в положении 1 нативной сигнальной последовательности PH20 человека из 35 аминокислот, и стоп-кодон после ДНК, кодирующей тирозин, соответствующий аминокислотной позиции 482 человеческой гиалуронидазы PH20, приведенной в SEQ ID NO: 107, после которого расположен сайт рестрикции BamHI. Следовательно, направляемая промотором CMV транскрипция конструкции PCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ24) приводит к молекуле мРНК, которая кодирует аминокислоты 1-482 PH20 человека (приведена в SEQ ID NO: 109) и аминокислоты 1-186 дигидрофолатредуктазы мыши (приведены в SEQ ID NO: 141), разделенные внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES).

Не трансфицированные клетки DG44 CHO культивировали в модифицированной GIBCO CD-CHO среде для DHFR(-) клеток, дополненной 4 mM глутамина и 18 мл/л плуороника F68/L (Gibco), и для подготовки к трансфекции высевали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл во встряхиваемый флакон. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе при скорости перемешивания 120 оборотов в минуту. Экспоненциально растущие не трансфицированные клетки DG44 CHO проверяли на жизнеспособность до трансфекции.

Шестидесят миллионов жизнеспособных клеток из культуры не трансфицированных клеток DG44 CHO осаждали и ресуспендировали до плотности 2×10^7 клеток в 0,7 мл 2× буфера для трансфекции (2× HeBS: 40 Mepes mM, pH 7,0, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 12 mM декстроза). К каждой аликвоте ресуспендированных клеток добавляли 0,09 мл (250 мкг) линейной плазмиды HZ24 (линеаризо-

вали в течение ночи эндонуклеазой Cla I (New England Biolabs), и смесь клетки/ДНК переносили в кюветы для электропорации ВТХ (Gentronics) с зазором 0,4 см при комнатной температуре. Для отрицательного контроля проводили электропорацию клеток без плазмидной ДНК. Смесь клетки/плазмида электропорировали разрядом конденсатора при 330 В и 960 мкФ или при 350 В и 960 мкФ.

Клетки переносили из кюветы после электропорации в 5 мл модифицированной среды CD-CHO для DHFR(-) клеток, дополненной 4 мМ глутамина и 18 мл/л плуроника F68/L (Gibco), и культивировали в лунках 6-луночных планшетов для культивирования без селекции в течение 2 дней при 37°C и 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе.

Через два дня после электропорации из каждой лунки отбирали 0,5 мл культуральной среды и проверяли ее на наличие гиалуронидазной активности с помощью анализа мутности, описанного в Примере 12. Результаты представлены в табл. 17.

Таблица 17. Начальная гиалуронидазная активность трансфицированных HZ24 клеток DG44 CHO через 40 ч после трансфекции

	Разведение	Активность ед/мл
Трансфекция 1 при 330 В	1 к 10	0,25
Трансфекция 2 при 350 В	1 к 10	0,52
Отрицательный контроль	1 к 10	0,015

Клетки из трансфекции 2 (350 В) отбирали из культуральной лунки, подсчитывали и разбавляли до 1×10^4 - 2×10^4 жизнеспособных клеток на 1 мл. Аликвоту суспензии клеток 0,1 мл переносили в каждую лунку пяти 96-луночных планшетов для культивирования с круглодонными лунками. В лунки с клетками добавляли сто микролитров среды CD-CHO (GIBCO), дополненной 4 мМ GlutaMAX™-1 (GIBCO™, Invitrogen Corporation) и не содержащей гипоксантина и тимидина (конечный объем 0,2 мл).

Из 5 планшетов были выделены десять клонов, выращиваемых без метотрексата (табл. 18).

Таблица 18. Гиалуронидазная активность идентифицированных клонов

Номер планшета и лунки	Относительная гиалуронидазная активность
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103
1B9	304
2D9	273
4D10	302

Шесть клонов HZ24 дополнительно культивировали и переносили во флаконы в виде суспензии отдельных клеток. Клоны 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11 и 4D10 высевали в 96-луночные планшеты для культивирования с круглодонными лунками методом двумерного бесконечного разведения, при котором клетки разводили 1 : 2 в лунках планшета сверху вниз и 1 : 3 в лунках планшета слева направо, начиная с 5000 клеток в верхней левой ячейке. Для обеспечения необходимых факторов роста в первые дни роста в культуре разведенные суспензии клонов культивировали в присутствии 500 нМ трансфицированных DG44 CHO клеток на лунку. Для каждого субклона было заполнено десять планшетов, где 5 планшетов содержали 50 нМ метотрексата и 5 планшетов не содержали метотрексат.

Клон 3D3 дал 24 визуально определенных субклона, 13 из которых обнаружены в планшетах без метотрексата, а 11 - в планшетах с 50 нМ метотрексата. Значительную гиалуронидазную активность определили в супернатантах 8 из 24 субклонов (> 50 ед/мл), указанные 8 субклонов наращивали во флаконах для культивирования T-25. Идентифицированные в присутствии метотрексата клоны культивировали с добавлением 50 нМ метотрексата. Клон 3D35M растили в присутствии 500 нМ метотрексата, что привело к получению клона, продуцирующего при культивировании во флаконе при перемешивании свыше 1000 единиц/мл гиалуронидазы (клон 3D35M или Gen1 3D35M). Затем был получен банк клеток 3D35M.

Пример 12. Определение гиалуронидазной активности растворимой gHuPH20.

Гиалуронидазную активность растворимой gHuPH20 определяли в таких образцах, как клеточные культуры, очищенные фракции и очищенный раствор, с помощью турбидометрического анализа, который основан на образовании нерастворимого осадка при связывании гиалуроновой кислоты с сывороточным альбумином. Активность измеряли путем инкубации растворимой gHuPH20 с гиалуронатом натрия (гиалуроновой кислотой) в течение определенного периода времени (10 мин) с последующим осаждением нерасщепленного гиалуроната натрия при добавлении подкисленного сывороточного альбумина. Мутность полученного образца измеряли при 640 нм после 30-минутной инкубации. Уменьшение мут-

ности в результате ферментативной активности гиалуронидазы к своему субстрату гиалуронату натрия является мерой активности растворимой гиалуронидазы gHuPH20. Анализ проводят с помощью калибровочной кривой, полученной с использованием разведений стандарта растворимой gHuPH20, определение активности образцов проводили относительно этой калибровочной кривой.

Образцы разбавляли с помощью раствора для разведения фермента. Раствор для разведения фермента готовили, растворяя $33,0 \pm 0,05$ мг гидролизованного желатина в 25,0 мл 50 мМ реакционного буфера PIPES (140 мМ NaCl, 50 мМ PIPES, pH 5,5) и 25,0 мл SWFI, и разбавляя 0,2 мл 25% раствора человеческого сывороточного альбумина в полученной смеси и перемешивая на вортексе раствор в течение 30 секунд. Раствор готовили за 2 часа до применения и хранили его на льду до использования. Образцы разводили до приблизительно 1-2 ед/мл. Как правило, максимальное шаговое разведение не превышало 1 : 100 и начальный объем образца для первого разведения составлял не менее 20 мкл. Минимальные объемы образцов, необходимые для проведения анализа, для образцов, полученных в ходе выделения, и фракций FPLC (жидкостная хроматография быстрого разрешения) составляли 80 мкл; для культурального супернатанта - 1 мл; для концентрированного материала - 80 мкл; для очищенного образца или образца на заключительном этапе выделения - 80 мкл. Разведения готовили в трех повторностях в 96-луночных планшетах с низким связыванием белка, 30 мкл каждого разведения переносили в планшеты Optilux с черным/прозрачным дном (BD BioSciences).

Для получения стандартной кривой в растворе для разведения ферментов готовили разведения известной растворимой gHuPH20 с концентрацией 2,5 ед/мл, которые добавляли в планшет Optilux в трех повторностях. Использовали разведения 0 ед/мл, 0,25 ед/мл, 0,5 ед/мл, 1,0 ед/мл, 1,5 ед/мл, 2,0 ед/мл, и 2,5 ед/мл. В качестве отрицательного контроля в планшете предусмотрели лунки без реагента, которые содержали только 60 мкл раствора для разведения ферментов. Затем планшет закрывали и нагревали в течение 5 минут при 37°C. Крышку снимали и содержимое планшета перемешивали на шейкере в течение 10 секунд. После перемешивания планшет снова нагревали и в жидкостный манипулятор MULTIDROP 384 Liquid Handling Device вносили теплый 0,25 мг/мл раствор гиалуроната натрия (готовят растворением 100 мг гиалуроната натрия (LifeCore Biomedical) в 20,0 мл SWFI. Раствор перемешивали, осторожно вращая и/или покачивая емкость при температуре 2-8°C в течение 2-4 ч или до полного растворения). Реакционный планшет переносили в устройство MULTIDROP 384 и реакцию начинали, нажимая клавишу "Старт", что приводило к добавлению 30 мкл раствора гиалуроната натрия в каждую лунку. Планшет вынимали из MULTIDROP 384 и встряхивали в течение 10 с, а затем нагревали с закрытой крышкой. Планшет инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали с помощью MULTIDROP 384, в который загружали сывороточный рабочий раствор при увеличении вносимого объема до 240 мкл. (25 мл исходного сывороточного раствора [1 объем лошадиной сыворотки (Sigma) разбавляли 9 объемами 500 мМ ацетатного буферного раствора и pH доводили до 3,1 соляной кислотой] добавляли к 75 мл 500 мМ ацетатного буферного раствора). Планшет вынимали из нагревающего блока и помещали в MULTIDROP 384, который добавлял по 240 мкл сывороточного рабочего раствора в лунку. Планшет вынимали и встряхивали в течение 10 с. Через 15 мин мутность образцов измеряли при 640 нм, гиалуронидазную активность (в ед/мл) каждого образца определяли сравнением со стандартной кривой.

Удельную активность (единиц/мг) рассчитывали делением гиалуронидазной активности (ед/мл) на концентрацию белка (мг/мл).

Пример 13. Получение и очистка человеческой sPH20 Gen1.

А. Получение в биореакторе объемом 5 л.

Колбу с 3D35M размораживали и клетки растили в перемешиваемых на шейкере колбах, затем в 1 л вращающихся колбах в CD-CHO среде (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния) с добавлением 100 нМ метотрексата и GlutaMAKCTM-1 (Invitrogen). Клетки переносили из вращающихся колб в 5 л биореактор (Braun) при плотности инокуляции 4×10^5 жизнеспособных клеток/мл. Температура была установлена на 37°C, pH 7,2 (начальная установка), количество растворенного кислорода составляло 25%, подача воздуха составляла 0-100 см³/мин. На 168 часу добавили 250 мл питательной среды # 1 (CD CHO с 50 г/л глюкозы). На 216 часу добавили 250 мл питательной среды # 2 (CD CHO с 50 г/л глюкозы и 10 мМ бутирата натрия), на 264 часу вновь добавили 250 мл питательной среды # 2. Окончательная продуктивность составила 1600 единиц на мл с максимальной плотностью клеток 6×10^6 клеток/мл. Добавление бутирата натрия резко повысило продукцию растворимой gHuPH20 на завершающей стадии получения.

Кондиционированную среду от клона 3D35M очищали глубинной фильтрацией и тангенциальной проточной диафильтрацией в 10 HEPES мМ pH 7,0. Растворимую gHuPH20 затем последовательно очищали с помощью хроматографии на ионообменной Q-сефарозе (Pharmacia), гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе (Pharmacia), на фенилборонате (Prometics) и хроматографии на гидроксипатите (Bio-rad, Richmond, Калифорния).

Растворимую gHuPH20, связавшуюся с Q-сефарозой, элюировали 400 мМ NaCl в том же буфере. Элюат разбавляли 2М раствором сульфата аммония до конечной концентрации 500 мМ сульфата аммония и пропускали через колонку с фенилсефарозой (низкозамещенную) с последующим связыванием в тех же условиях на фенилборонатной смоле. Растворимую gHuPH20 элюировали с фенилсефарозной

смолы NEPES с pH 6,9 после отмывания 50 mM бисинном при pH 9,0 без сульфата аммония. Элюат загружали на керамический гидроксипатитный носитель при pH 6,9 в 5 mM фосфате калия и 1 mM CaCl₂ и элюировали 80 mM фосфатом калия, pH 7,4 с 0,1 mM CaCl₂.

Полученная очищенная растворимая gHuPH20 обладала удельной активностью более 65000 USP единиц/мг белка по данным анализа микромутности (Пример 3) с использованием стандарта сравнения USP. Очищенную sPH20 элюировали с колонки со стирол-дивинилбензольным носителем Pharmacia 5RPC в виде одного пика градиентом от 0,1% TFA/H₂O до 0,1% TFA/90% ацетонитрил/10% H₂O с 24 по 26 мин, при анализе методом SDS-электрофореза белок давал одну широкую полосу, соответствующую 61 кДа, после обработки ПНГазой-F белок давал узкую полосу, соответствующую 51 кДа. N-концевое секвенирование показало, что лидерный пептид эффективно удалялся.

В. Нарращивание культуры клеток в 100 л биореакторе для культивирования клеток.

Для раздельной очистки растворимой gHuPH20 из четырех различных колб с клетками 3D35M и получения 4 отдельных партий sHuPH20 HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C и HUA0420C использовали масштабирование процесса получения. Клетки из каждой колбы отдельно наращивали и культивировали в 125 л биореакторе, затем белок очищали с использованием колоночной хроматографии. Для оценки таких параметров как выход фермента на протяжении всего процесса отбирали пробы. В приведенном ниже описании процесса указаны примеры условий для таких процессов и параметров, как запуск биореактора и объем питательной среды, плотность клеток при переносе и объемы отмывания и элюции. Точные численные значения незначительно отличались для каждой партии, они подробно описаны в табл. 24-30.

Четыре колбы с клетками 3D35M размораживали на водяной бане при 37°C, затем к клеткам добавляли CD-CHO среду, содержащую 100 nM метотрексата и 40 мл/л GlutaMAX, и клетки центрифугировали. Клетки ресуспендировали в 125 мл встряхиваемой колбе в 20 мл свежей среды, после чего колбу помещали в инкубатор с 7% CO₂ при 37°C. Клетки растили в объеме 40 мл в 125 мл колбе при перемешивании на шейкере. Когда плотность клеток достигла $1,5-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру растили в 125 мл вращающейся колбе в объеме 100 мл. Колбу инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла $1,5-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру растили в 250 мл вращающейся колбе в объеме 200 мл, колбы инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла $1,5-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру растили в 1 л вращающейся колбе в объеме 800 мл, колбу инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла $1,5-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру растили в 6 л вращающейся колбе в объеме 5 л, колбу инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток достигла $1,5-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, культуру растили в 36 л вращающейся колбе в объеме 20 л, колбы инкубировали при 37°C и 7% CO₂.

125 л реактор стерилизовали паром при 121°C и 20 PSI (фунт на квадратный дюйм), после чего добавляли 65 л CD-CHO. Перед использованием реактора его проверили на загрязнение. Когда плотность клеток в 36 л вращающейся колбе достигла $1,8-2,5 \times 10^6$ клеток/мл, 20 л культуры клеток перенесли из 36 л вращающейся колбы в 125 л биореактор (Braun), в результате чего окончательный объем составил 85 л, а плотность посева составила около 4×10^5 клеток/мл. Температуру установили на 37°C, pH 7,2; уровень растворенного кислорода составлял $25\% \pm 10\%$; скорость вращения крыльчатки 50 об/мин; давление в емкости 3 фунта на квадратный дюйм; количество барботируемого воздуха 1 л/мин; подача воздуха 1 л/мин. Каждый день содержимое реактора исследовали на количество клеток, pH, проводили анализ среды, анализ продукции и устойчивости белка. Во время культивирования добавляли питательные вещества. На 6 день добавили 3,4 л питательной среды # 1 (CD CHO + 50 г/л глюкозы + 40 мл/л GlutaMAX™-1) и температуру культивирования изменили на 36,5°C. На 9 день добавили 3,5 л питательной среды # 2 (CD CHO + 40 г/л глюкозы + 50 мл/л GlutaMAX™-1 + 1,1 г/л бутирата натрия) и температуру культивирования изменили на 36°C. На 11 день добавили 3,7 л питательной среды # 3 (CD CHO + 50 г/л глюкозы + 40 мл/л GlutaMAX™-1 + 1,1 г/л бутирата натрия) и температуру культивирования изменили на 35,5°C. Клетки из реактора собирали на 14 день, или когда жизнеспособность клеток падала ниже 50%. Процесс приводил к получению растворимой gHuPH20 с ферментативной активностью 1600 ед/мл при максимальной плотности клеток 8 млн клеток/мл. При сборе клеток культуру исследовали на микоплазму, биологическое загрязнение, эндотоксин и вирусы *in vitro* и *in vivo*, вирусные частицы обнаруживали просвечивающим электронным микроскопом (ПЭМ), а также исследовали ферментативную активность.

Сто литров собранной из биореактора клеточной культуры фильтровали через серию одноразовых фильтров с полиэфирсульфонным фильтрующим материалом (Sartorius): сначала фильтровали через картридж с порами 8,0 мкм, затем 0,65 мкм, 0,22 мкм, и, наконец, через 0,22 мкм фильтр Sartopore площадью 2000 см² в 100 л стерильный баллон для хранения. Культуру сконцентрировали в 10 раз с использованием двух TFF (тангенциальный проточный фильтр) со спиральными полиэфирсульфонными фильтрами с MWCO 30 кДа (Millipore), затем провели 6 × замену буфера на 10 mM NEPES с 25 mM Na₂SO₄, pH 7,0 с помощью последнего 0,22 мкм фильтра, и среду переносили в 20 л стерильный баллон для хранения. В табл. 19 приведены данные, относящиеся к культивированию клеток, их сбору, стадиям концентрирования и замены буфера.

Таблица 19. Данные по культивированию клеток, их сбору, стадиям концентрирования и замены буфера

Параметр	HUA0406C	HUA04010C	HUA0415C	HUA0420C
Время от размораживания до внесения в 100 л биореактор (дней)	21	19	17	18
Плотность инокуляции в 100 л ($\times 10^6$ клеток/мл)	0,45	0,33	0,44	0,46
Время удвоения количества клеток при логарифмическом росте (ч)	29,8	27,3	29,2	23,5
Макс. плотность клеток ($\times 10^6$ клеток/мл)	5,65	8,70	6,07	9,70
Жизнеспособность собранных клеток (%)	41	48	41	41
Титр собранной среды (ед/мл)	1964	1670	991	1319
Время культивирования в 100 л биореакторе (дней)	13	13	12	13
Объем очищенной среды (мл)	81800	93300	91800	89100
Активность собранного отфильтрованного фермента (ед/мл)	2385	1768	1039	1425
Активность сконцентрированного фермента (ед/мл)	22954	17091	8561	17785
Активность сконцентрированного фермента после замены буфера (ед/мл)	15829	11649	9915	8679
Активность сконцентрированного отфильтрованного фермента после замены буфера (ед/мл)	21550	10882	9471	8527
Объем после концентрирования и замены буфера (мл)	10699	13578	12727	20500
Отношение количества единиц фермента/собранный фермент	0,87	0,96	1,32	1,4

Готовили ионообменную колонку с Q сефарозой (Pharmacia) (3 л смолы, высота 20 см, диаметр 14 см). Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. Колонку уравнивали 5 объемами 10 мМ Трис, 20 мМ Na₂SO₄, pH 7,5. На Q колонку при скорости 100 см/ч наносили сконцентрированную диафильтрованную среду. Колонку промывали 5 объемами 10 мМ Трис, 20 мМ Na₂SO₄, pH 7,5 и 10 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, pH 7,0. Белок элюировали 10 мМ HEPES, 400 мМ NaCl, pH 7,0 и фильтровали через 0,22 мкм фильтр в стерильную емкость.

Затем проводили гидрофобную хроматографию на фенилсефарозе (Pharmacia). Готовили колонку с фенилсефарозой (PS) (9,1 л смолы, высота 29 см, диаметр 20 см). Колонку уравнивали 5 объемами 5 мМ фосфата калия с 0,5 М сульфатом аммония, 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0. К элюированному, как описано выше, белку добавляли 2М раствор сульфата аммония, 1 М фосфат калия и 1 М CaCl₂ до конечных концентраций 5 мМ, 0,5 М и 0,1 мМ, соответственно. Белок загружали на PS колонку при скорости 100 см/ч. При скорости 100 см/ч через колонку пропускали 5 мМ фосфат калия, 0,5 М сульфат аммония и 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0. Прошедший через колонку раствор пропускали через 0,22 мкм фильтр и собирали в стерильную емкость.

Затем очищенный на PS белок загружали на аминифенилборонатную колонку (ProMedics) (6,3 л смолы, высота 20 см, диаметр 20 см), которую предварительно уравнивали 5 объемами 5 мМ фосфата калия с 0,5 М сульфатом аммония. Белок пропускали через колонку со скоростью 100 см/ч и колонку промывали 5 мМ фосфатом калия с 0,5 М сульфатом аммония, pH 7,0. Затем колонку промывали 20 мМ бисинном с 100 мМ NaCl, pH 9,0, белок элюировали 50 мМ HEPES, 100 мМ NaCl pH 6,9 и собирали через стерильный фильтр в 20 л стерильную емкость. Элюат исследовали на наличие биологического загрязнения, определяли концентрацию белка и активность фермента.

Колонку с гидроксиапатитом (BioRad) (1,6 л смолы, высота 10 см, диаметр 14 см) уравнивали 5 мМ фосфатом калия с 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂, pH 7,0. Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. К очищенному на аминифенилборонатной смоле белку добавляли фосфат калия и CaCl₂ до конечной концентрации 5 мМ фосфата калия и 0,1 мМ CaCl₂, раствор наносили на колонку с гидроксиапатитом при скорости 100 см/час. Колонку промывали 5 мМ фосфатом калия, pH 7,0 с 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂, затем 10 мМ фосфатом калия, pH 7,0 с 100 мМ NaCl, 0,1 мМ CaCl₂. Белок элюировали 70 мМ фосфатом калия с pH 7,0, элюат фильтровали через 0,22 мкм фильтр в 5 л стерильную емкость для хранения. Элюат исследовали на наличие биологического загрязнения, определяли концентрацию белка и активность фермента.

Очищенный на колонке с гидроксипатитом белок затем пропускали через 20 нм фильтр для удаления вирусов с помощью резервуара для нагнетания давления. Белок вносили в резервуар DV20 для нагнетания давления и фильтровали (Pall Corporation) через Ultipor DV20 фильтр с 20 нм порами (Pall Corporation) в стерильную 20 л емкость для хранения. Фильтрат исследовали на концентрацию белка, ферментативную активность, содержание олигосахаридов, проводили характеризацию моносахаридов и сиаловых кислот и связанных с процессом выделения и очистки примесей. Белок в фильтрате затем концентрировали до 1 мг/мл, используя систему тангенциальной проточной фильтрации (TFF) Sartocoon Slice (Sartorius) с пределом исключения 10 кД по молекулярной массе (MWCO). Фильтр подготавливали, промывая HEPES/солевым раствором (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, pH 7,0), и пермеат исследовали на pH и проводимость. После концентрирования раствор белка тестировали на концентрацию белка и ферментативную активность. Затем концентрированный белок перевели 6 × в 10 mM HEPES буфер с 130 mM NaCl, pH 7,0. Концентрированный белок пропускали через 0,22 мкм фильтр в 20 л стерильную емкость для хранения. Раствор белка исследовали на концентрацию белка, ферментативную активность, количество свободных сульфгидрильных групп, проводили характеризацию олигосахаридов и определяли осмолярность.

В табл. с 20 по 26 приведены данные, относящиеся к каждой из описанных выше стадий очистки, проводимых для каждой партии клеток 3D35M.

Таблица 20. Данные по очистке белка на Q-сефарозе

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Нанесенный объем (мл)	10647	13524	12852	20418
Отношение нанесенный объем/объем смолы	3,1	4,9	4,5	7,3
Объем колонки (мл)	2770	3840	2850	2880
Объем элюата (мл)	6108	5923	5759	6284
Конц. белка в элюате (мг/мл)	2,8	3,05	2,80	2,86
Анализ активности в элюате (ед/мл)	24493	26683	18321	21052
Выход фермента (%)	65	107	87	76

Таблица 21. Данные по очистке белка на колонке с фенилсефарозой

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Объем до добавления исходного раствора (мл)	5670	5015	5694	6251
Нанесенный объем (мл)	7599	6693	7631	8360
Объем колонки (мл)	9106	9420	9340	9420
Отношение нанесенный объем/объем смолы	0,8	0,71	0,82	0,89
Объем элюата (мл)	16144	18010	16960	17328
Конц. белка в элюате (мг/мл)	0,4	0,33	0,33	0,38
Анализ активности в элюате (ед/мл)	8806	6585	4472	7509
Выход белка (%)	41	40	36	37
Выход фермента (%)	102	88	82	96

Таблица 22. Данные по очистке белка на аминофенилборонатной колонке

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Нанесенный объем (мл)	16136	17958	16931	17884
Отношение нанесенный объем/объем смолы	2,99	3,15	3,08	2,98
Объем колонки (мл)	5400	5700	5500	5300
Объем элюата (мл)	17595	22084	20686	19145
Конц. белка в элюате (мг/мл)	0,0	0,03	0,03	0,04
Конц. белка в фильтрованном элюате (мг/мл)	не определяли	0,03	0,00	0,04
Анализ активности в элюате (ед/мл)	4050	2410	1523	4721
Выход белка (%)	0	11	11	12
Выход фермента (%)	не определяли	41	40	69

Таблица 23. Данные по очистке белка на гидроксиапатитной колонке

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Объем до добавления исходного раствора (мл)	16345	20799	20640	19103
Отношение нанесенный объем/объем смолы	10,95	13,58	14,19	12,81
Объем колонки (мл)	1500	1540	1462	1500
Нанесенный объем (мл)	16429	20917	20746	19213
Объем элюата (мл)	4100	2415	1936	2419
Конц. белка в элюате (мг/мл)	не определяли	0,24	0,17	0,23
Конц. белка в фильтрованном элюате (мг/мл)	не определяли	не определяли	0,17	не определяли
Анализ активности в элюате (ед/мл)	14051	29089	20424	29826
Выход белка (%)	не определяли	93	53	73
Выход фермента (%)	87	118	140	104

Таблица 24. Данные по фильтрации на DV20

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Начальный объем (мл)	4077	2233	1917	2419
Объем фильтрата (мл)	4602	3334	2963	3504
Конц. белка в фильтрате (мг/мл)	0,1	не определяли	0,09	не определяли
Конц. белка в фильтрованном элюате (мг/мл)	не определяли	0,15	0,09	0,16
Выход белка (%)	не определяли	93	82	101

Таблица 25. Окончательные данные по концентрации

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Начальный объем (мл)	4575	3298	2963	3492
Объем концентрата (мл)	562	407	237	316
Конц. белка в концентрате (мг/мл)	0,9	1,24	1,16	1,73
Выход белка (%)	111	102	103	98

Таблица 26. Данные по замене буфера в окончательном препарате

Параметр	HUA0406C	HUA0410C	HUA0415C	HUA0420C
Начальный объем (мл)	562	407	237	316
Конечный объем концентрата после замены буфера (мл)	594	516	310	554
Конц. белка в концентрате (мг/мл)	1,00	0,97	0,98	1,00
Конц. белка в фильтрованном концентрате (мг/мл)	0,95	0,92	0,95	1,02
Выход белка (%)	118	99	110	101

Очищенную и сконцентрированную растворимую gHuPH20 асептически перенесли в стерильные колбы на 5 мл и 1 мл. Раствор белка пропускали через 0,22 мкм фильтр к контролируемому оператором насосу, который использовали для заполнения колб, которое контролировали гравиметрически. Колбы были закрыты пробками и дополнительно закручивающимися крышками. Закрытые колбы визуально проверяли на наличие посторонних частиц, а затем подписывали. Затем колбы мгновенно замораживали погружением в жидкий азот не более чем на 1 минуту и хранили при $\leq -15^{\circ}\text{C}$ ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$).

Пример 14. Получение клеток Gen2, продуцирующих растворимую человеческую PH20 (gHuPH20).

Клетки линии Gen1 3D35M, описанные в Примере 2, адаптировали к более высоким уровням метотрексата и получали 2 поколение клонов (Gen 2). Клетки 3D35M из стабильных содержащих метотрексат культур высевали в CD CHO среду, содержащую 4мМ GlutaMAX-1™ и 1,0 мкМ метотрексата. Клетки адаптировали к повышенному уровню метотрексата и пассировали их 9 раз в течение 46 дней при 37°C и 7% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Выросшую популяцию клеток клонировали методом предельных разведений в 96-луночных культуральных планшетах, содержащих среду с 2,0 мкМ метотрексата. Примерно через 4 недели клоны идентифицировали, и клон 3E10B был выбран для культивирования. 3E10B клетки выращивали в среде CD CHO, содержащей 4 мМ GlutaMAX-1™ и 2,0 мкМ метотрексата в течение 20 пассажей. Из клеточной линии 3E10B получили банк клеток, клетки заморозили и использо-

вали для последующих исследований.

Культивирование клеточной линии продолжали, выращивая 3E10B клетки в среде CD CHO, содержащей 4 мМ GlutaMAX-1™ и 4,0 мкМ метотрексата. После 12 пассажа клетки заморозили во флаконах, получив банк клеток для исследования (RCB). Один флакон из RCB разморозили и культивировали в среде, содержащей 8,0 мкМ метотрексата. Через 5 дней концентрацию метотрексата в среде увеличили до 16,0 мкМ, затем через 18 дней концентрацию увеличили до 20,0 мкМ. Клетки после 8 пассажа в среде, содержащей 20,0 мкМ метотрексата, клонировали методом предельных разведений в 96-луночных планшетах для культивирования, содержащих среду CD CHO с 4 мМ GlutaMAX-1™ и 20,0 мкМ метотрексата. Клоны идентифицировали через 5-6 недель, клон 2B2 был выбран для культивирования в среде, содержащей 20,0 мкМ метотрексата. После 11 пассажа клетки 2B2 заморозили во флаконах в виде банка клеток для исследования (RCB).

Полученные 2B2 клетки являются дефектными по дигидрофолатредуктазе (DHFR-) клетками CHO DG44, экспрессирующими растворимую рекомбинантную человеческую PH20 (gHuPH20). Растворимая PH20 присутствует в 2B2 клетках при количестве копий приблизительно 206 копий/клетку. Саузерн-блоттинг анализ расщепленной SpeI, XbaI и BamHI/Hind III геномной ДНК клеток 2B2 с использованием специфичного к gHuPH20 зонда показал следующий профиль расщепления рестриктазами: при расщеплении ДНК SpeI была выявлена одна крупная полоса гибридизации ~ 7,7 Кб и четыре минорных полосы гибридизации (~ 13,9, ~ 6,6, ~ 5,7 и ~ 4,6 Кб); при расщеплении ДНК XbaI была выявлена одна крупная полоса гибридизации ~ 5,0 Кб и две минорных полосы гибридизации (~ 13,9 и ~ 6,5 Кб), при расщеплении ДНК BamHI/Hind III выявили одну крупную полосу гибридизации ~ 1,4 Кб. Анализ последовательности мРНК транскрипта показал, что полученная кДНК (SEQ ID NO: 56) идентична исходной последовательности (SEQ ID NO: 49) за исключением одной пары оснований в положении 1131, в котором наблюдался тимидин (Т) вместо ожидаемого цитозина (С). Это молчащая мутация, не влияющая на аминокислотную последовательность.

Пример 15.

А. Получение растворимой gHuPH20 Gen2 в 300 л биореакторе для культивирования клеток.

Колбу с HZ24-2B2 клетками разморозили и клетки растили в перемешиваемых на шейкере колбах, затем в 36 л вращающихся колбах в CD-CHO среде (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния) с добавлением 20 мкМ метотрексата и GlutaMAX™-1 (Invitrogen). Колбу с клетками разморозили при 37°C на водяной бане, к содержимому добавили среду и клетки центрифугировали. Клетки ресуспендировали в 125 мл колбе в 20 мл свежей среды при перемешивании, колбу помещали в инкубатор при 37°C и 7% CO₂. Клетки растили в объеме 40 мл в 125 мл встряхиваемой колбе. Когда плотность клеток превысила 1,5×10⁶ клеток/мл, культуру растили в 125 мл вращающейся колбе в объеме 100 мл. Колбу инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток превысила 1,5×10⁶ клеток/мл, культуру растили в 250 мл вращающейся колбе в объеме 200 мл, колбу инкубировали при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток превысила 1,5×10⁶ клеток/мл, культуру растили в 1 л вращающейся колбе в объеме 800 мл при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток превысила 1,5×10⁶ клеток/мл, культуру растили в 6 л вращающейся колбе в объеме 5000 мл при 37°C и 7% CO₂. Когда плотность клеток превысила 1,5×10⁶ клеток/мл, культуру растили в 36 л вращающейся колбе в объеме 32 л при 37°C и 7% CO₂.

Реактор объемом 400 л стерилизовали и в него добавляли 230 мл CD-CHO среды. Перед использованием реактор был проверен на загрязнение. Приблизительно 30 л клеток перенесли из 36 л вращающейся колбы в 400 л биореактор (Braun) при плотности посева 4,0×10⁵ жизнеспособных клеток/мл и общем объеме 260 л. Температуру установили на 37°C, pH 7,2; скорость вращения крыльчатки 40-55 об/мин; давление в емкости 3 фунта на квадратный дюйм; количество барботируемого воздуха 0,5-1,5 л/мин; подача воздуха 3 л/мин. Каждый день содержимое реактора исследовали на количество клеток, pH, проводили анализ среды, анализ продукции и устойчивости белка. В ходе культивирования также добавляли питательные вещества. Через 120 ч (день 5) добавили 10,4 л питательной среды # 1 (4 × CD-CHO + 33 г/л глюкозы + 160 мл/л GlutaMAX-1™ + 83 мл/л дрожжевого экстракта Yeastolate + 33 мг/л рекомбинантного человеческого инсулина). Через 168 ч (день 7) добавили 10,8 л питательной среды # 2 (2 × CD-CHO + 33 г/л глюкозы + 80 мл/л GlutaMAX-1™ + 167 мл/л дрожжевого экстракта Yeastolate + 0,92 г/л бутирата натрия), температуру культивирования понизили до 36,5°C. Через 216 часов (день 9) добавили 10,8 л питательной среды # 3 (1 × CD-CHO + 50 г/л глюкозы + 50 мл/л GlutaMAX-1™ + 250 мл/л дрожжевого экстракта Yeastolate + 1,80 г/л бутирата натрия), температуру культивирования понизили до 36°C. Через 264 ч (день 11) добавили 10,8 л питательной среды # 4 (1 × CD-CHO + 33 г/л глюкозы + 33 мл/л GlutaMAX-1™ + 250 мл/л дрожжевого экстракта Yeastolate + 0,92 г/л бутират натрия), температуру культивирования понизили до 35,5°C. Добавление питательной среды резко повысило продукцию растворимой gHuPH20 на завершающей стадии получения. Клетки из реактора собирали на 14 день или 15 день, или когда жизнеспособность клеток падала ниже 40%. Процесс приводил к получению растворимой gHuPH20 с ферментативной активностью 17000 ед/мл при максимальной плотности клеток 12 млн клеток/мл. При сборе клеток культуру исследовали на микоплазму, биологическое загрязнение, эндотоксин и вирусы in vitro и in vivo, вирусные частицы обнаруживали просвечивающим электронным микро-

скопом (ПЭМ), а также исследовали ферментативную активность.

Культуру прокачивали перистальтическим насосом через четыре параллельно соединенных модуля системы фильтрации Millistak (Millipore), каждый из которых содержал слой диатомовой земли размером 4-8 мкм и слой диатомовой земли размером 1,4-1,1 мкм, а затем целлюлозную мембрану, после чего жидкость проходила через вторую систему фильтрации Millistak (Millipore), содержащую слой диатомовой земли размером 0,4-0,11 мкм и слой диатомовой земли размером <0,1 мкм, а затем целлюлозную мембрану, затем жидкость проходила через последний 0,22 мкм фильтр и ее собирали в стерильную одноразовую гибкую емкость вместимостью 350 л. К собранной культуральной жидкости добавляли ЭДТА до 10 mM и 10 mM Трис до pH 7,5.

В сконцентрированной диафильтрованной собранной жидкости инактивировали вирусы. До инактивации вирусов готовили 10% раствор Тритона X-100 с 3% три(н-бутил)фосфатом (TNBP). Сконцентрированную диафильтрованную собранную жидкость обрабатывали 1% Тритоном X-100 с 0,3% TNBP в течение 1 ч в 36 л стеклянном реакционном сосуде непосредственно перед очисткой на Q колонке.

В. Очистка растворимой gHuPH20 из Gen2.

Была подготовлена колонка с ионообменным носителем Q сефарозой (Pharmacia) (9 л смолы, высота 29 см, диаметр 20 см). Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. Колонку уравнивали 5 объемами 10 mM Трис, 20 mM Na₂SO₄, pH 7,5. На Q колонку при скорости 100 см³/ч наносили сконцентрированную диафильтрованную среду после инактивации вирусов. Колонку промывали 5 объемами 10 mM трис, 20 mM Na₂SO₄, pH 7,5 и 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,0. Белок элюировали 10 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,0 и фильтровали через 0,22 мкм фильтр в стерильную емкость. Элюат исследовали на наличие микрофлоры, определяли концентрацию белка и гиалуронидазную активность. В начале и в конце процесса измеряли поглощение A₂₈₀.

Затем проводили гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе (Pharmacia). Готовили колонку с фенилсефарозой (PS) (19 - 21 л смолы, высота 29 см, диаметр 30 см). Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. Колонку уравнивали 5 объемами 5 mM фосфата калия с 0,5 M сульфатом аммония, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,0. К элюированному с Q сефарозы белку добавляли 2M раствор сульфата аммония, 1 M фосфат калия и 1 M CaCl₂ до конечных концентраций 5 mM, 0,5 M и 0,1 mM, соответственно. Белок загружали на PS колонку при скорости 100 см /час и прошедший через колонку раствор собирали. Колонку промывали при скорости 100 см³/ч 5 mM фосфатом калия с 0,5 M сульфатом аммония и 0,1 mM CaCl₂, pH 7,0, прошедший через колонку раствор собирали. Объединенный прошедший через колонку раствор пропускали через 0,22 мкм фильтр и собирали в стерильную емкость. Собранный раствор исследовали на наличие микрофлоры, определяли концентрацию белка и энзиматическую активность.

Готовили колонку с аминофенилборонатной смолой (Prometics). Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. Колонку уравнивали 5 объемами 5 mM фосфата калия с 0,5 M сульфатом аммония. Затем прошедшую через PS жидкость, содержащую очищенный белок, загружали на аминофенилборонатную колонку со скоростью 100 см/ч. Колонку промывали 5 mM фосфатом калия с 0,5 M сульфатом аммония, pH 7,0. Колонку промывали 20 mM бисинном с 0,5 M сульфатом аммония, pH 9,0. Колонку промывали 20 mM бисинном с 100 mM хлоридом натрия, pH 9,0. Белок элюировали 50 mM HEPES с 100 mM NaCl, pH 6,9, элюат пропускали через стерильный фильтр в стерильную емкость. Элюат исследовали на наличие микрофлоры, определяли концентрацию белка и энзиматическую активность.

Готовили колонку с гидроксипатитом (Biorad). Для определения pH, проводимости и анализа на эндотоксин были взяты образцы после промывания колонки. Колонку уравнивали 5 mM фосфатом калия с 100 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,0. К очищенному на аминофенилборонатной смоле раствору белка добавляли фосфат калия до конечной концентрации 5 mM и CaCl₂ до конечной концентрации 0,1 mM, раствор наносили на колонку при скорости 100 см³/ч. Колонку промывали 5 mM фосфатом калия, pH 7 с 100 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂. Затем колонку промывали 10 mM фосфатом калия, pH 7 с 100 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂. Белок элюировали 70 mM фосфатом калия, pH 7,0, элюат пропускали через 0,22 мкм стерильный фильтр в стерильную емкость. Элюат исследовали на наличие микрофлоры, определяли концентрацию белка и энзиматическую активность.

Очищенный на колонке с гидроксипатитом белок затем пропускали через фильтр для удаления вирусов. Сначала проводили подготовку стерильного фильтра Virosart (Sartorius), промывая его 2 л 70 mM фосфата калия, pH 7,0. Перед использованием профильтрованный буфер исследовали на pH и электропроводность. Очищенный на колонке с гидроксипатитом раствор белка затем прокачивали с помощью перистальтического насоса через 20 нм фильтр для удаления вирусов. Профильтрованный раствор белка в 70 mM фосфате калия, pH 7,0, пропускали через 0,22 мкм фильтр в стерильную емкость. Фильтрат исследовали на концентрацию белка, ферментативную активность, содержание олигосахаридов, проводили характеризацию моносахаридов и сиаловых кислот. Образец также тестировали на связанные с процессом выделения и очистки примеси.

Белок в фильтрате затем концентрировали до 10 мг/мл, используя систему тангенциальной проточ-

ной фильтрации (TFF) Sartoclon Slice (Sartorius) с пределом исключения 10 кД по молекулярной массе (MWCO). Фильтр подготавливали, промывая его 10 мМ гистидином с 130 мМ NaCl, pH 6,0, пермеат исследовали на pH и проводимость. После концентрирования раствор белка тестировали на концентрацию белка и ферментативную активность. Затем концентрированный белок перевели 6× в 10 мМ гистидиновый буфер с 130 мМ NaCl, pH 6,0. Концентрированный белок пропускали через 0,22 мкм фильтр в 20 л стерильную емкость для хранения. Раствор белка исследовали на концентрацию белка, ферментативную активность, количество свободных сульфгидрильных групп, проводили характеризацию олигосахаридов и определяли осмолярность.

Стерильной профильтрованный раствор белка асептически переносили порциями по 20 мл в 30 мл стерильные тefлоновые колбы (Nalgene). Затем колбы мгновенно замораживали и хранили при $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

С. Сравнение данных о продукции и очистке растворимой гHuPH20 из Gen1 и растворимой гHuPH20 из Gen2.

Продукция и очистка растворимой гHuPH20 из Gen2 в 300 л биореакторе для культивирования клеток характеризуется некоторыми изменениями в технологии по сравнению с продукцией и очисткой растворимой гHuPH20 из Gen1 в 100 л биореакторе для культивирования клеток (как описано в Примере 13B). В табл. 27 приведены примеры различий в технологии (в дополнение к обычному изменению масштаба).

Таблица 27

Различия процесса	Растворимая гHuPH20 Gen1	Растворимая гHuPH20 Gen2
Линия клеток	3D35M	2B2
Используемая для наращивания клеток среда	Содержит 0,10 мкМ метотрексат (0,045 мг/л)	Содержит 20 мкМ метотрексат (9 мг/л)
Среда для дальнейшего культивирования в объеме 6 л	Содержит 0,10 мкМ метотрексат	Не содержит метотрексат
36 л вращающаяся колба	Без дополнительных приспособлений Рабочий объем 20 л.	Оснащена устройствами для определения и контроля pH, уровня растворенного кислорода, барботирования и скорости подачи воздуха. Рабочий объем 32 л
Конечный рабочий объем в биореакторе	Приблизительно 100 л в 125 л биореакторе (начальный объем культуры + 65 л)	Приблизительно 300 л в 400 л биореакторе (начальный объем культуры + 260 л)
Культуральная среда в биореакторе	без рекомбинантного человеческого инсулина	5,0 мг/л рекомбинантного человеческого инсулина
Объем питательной среды	Составляла 4% от объема клеточной культуры в	Составляла 4% от объема клеточной культуры в биореакторе,

	биореакторе, т.е. 3,4, 3,5 и 3,7 л, что приводило к желаемому объему в биореакторе ~92 л.	т.е. 10,4, 10,8, 11,2 и 11,7 л, что приводило к желаемому объему в биореакторе ~303 л.
Питательная среда	Питательная среда #1: CD CHO + 50 г/л глюкозы + 8 mM GlutaMAX™-1 Питательная среда #2 (CD CHO + 50 г/л глюкозы + 8 mM GlutaMAX + 1,1 г/л бутират натрия Питательная среда #3: CD CHO + 50 г/л глюкозы + 8 mM GlutaMAX + 1,1 г/л бутират натрия	Питательная среда #1: 4× CD CHO + 33 г/л глюкозы + 32 mM Glutamax + 16,6 г/л Yeastolate + 33 мг/л рекомбинантного человеческого инсулина Питательная среда #2: 2× CD CHO + 33 г/л глюкозы + 16 mM Glutamax + 33,4 г/л Yeastolate + 0,92 г/л бутират натрия Питательная среда #3: 1× CD CHO + 50 г/л глюкозы + 10 mM Glutamax + 50 г/л Yeastolate + 1,80 г/л бутирата натрия Питательная среда #4: 1× CD CHO + 33 г/л глюкозы + 6.6 mM Glutamax + 50 г/л Yeastolate + 0,92 г/л бутирата натрия
Фильтрация клеточной культуры из биореактора	Четыре полиэфирсульфонных фильтра (8,0 мкМ, 0,65 мкМ, 0,22 мкМ и 0,22 мкМ) последовательно 100 л емкость для зранения	1 стадия – четыре модуля параллельно, каждый со слоем диатомовой земли размером 4-8 мкМ, слоем диатомовой земли размером 1,4-1,1 мкМ, затем с целлюлозной мембраной. 2 стадия – один модуль со слоем диатомовой земли размером 0,4-0,11 мкМ и со слоем диатомовой земли размером <0,1 мкМ, затем с целлюлозной мембраной. 3 стадия – 0,22 мкМ полиэфирсульфонный фильтр 300 л емкость для зранения К собранной клеточной культуре добавляли ЭДТА до 10 mM, 10 mM Трис до pH 7,5.
Концентрирование и замена буфера до хроматографии	Концентрировали с использованием 2 TFF со спиральными полиэфирсульфонными фильтрами Millipore с MWCO 30 кДа Замена буфера для 6× концентрата на 10 mM HEPES	Концентрировали с использованием фильтра Sartorius Sartoslice TFF MWCO 30 кДа Замена буфера для 10× концентрата на 10 mM Трис с 20 mM Na₂SO₄, pH
	с 25 mM NaCl, pH 7,0	7,5
	20 л стерильная емкость для хранения	50 л стерильная емкость для хранения
Инактивация вирусов до хроматографии	Не проводили	Инактивацию вирусов проводили добавлением 1% Тритона X-100 с 0,3% трибутилфосфата, pH 7,5,
1 стадия очистки (Q сефароза)	Не измеряли поглощение	Поглощение A ₂₈₀ измеряли в начале и в конце процесса
Фильтрация от вирусов после хроматографии	Фильтр Pall DV-20 (20 нм)	Фильтр Sartorius Virosart (20 нм)
Концентрирование и замена буфера после хроматографии	Буфер HEPES/солевой раствор pH 7,0 Белок концентрировали до 1 мг/мл	гистидин/солевой раствор, pH 6,0 Белок концентрировали до 10 мг/мл

Пример 16. Определение содержания сиаловых кислот и моносахаридов.

Содержание сиаловых кислот и моносахаридов в растворимой gHuPH20 можно определить с помощью обратнотазной жидкостной хроматографии (RPLC) после гидролиза трифторуксусной кислотой. В одном примере определяли содержание сиаловых кислот и моносахаридов в партии очищенной гиалуронидазы # HUB0701E (1,2 мг/мл; получена и очищена, как описано в Примере 15). 100 мкг образца гидролизировали 40% (по объему) трифторуксусной кислоты при 100°C в течение 4 ч в двух повторностях. После гидролиза образцы высушивали и суспендировали в 300 мкл воды. Аликвоту 45 мкл каждого ресус-

пендированного образца переносили в новую пробирку и высушивали, затем к содержимому пробирки добавляли 10 мкл 10 мг/мл раствора ацетата натрия. Выделенные моносахариды флуоресцентно метили добавлением 50 мкл раствора, содержащего 30 мг/мл 2-аминобензойной кислоты, 20 мг/мл цианоборгидрида натрия, около 40 мг/мл ацетата натрия и 20 мг/мл борной кислоты в метаноле. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 80°C в темноте. Реакцию получения меченых производных останавливали добавлением 440 мкл раствора А (0,2% (объем/объем) н-бутиламина, 0,5% (объем/объем) фосфорной кислоты, 1% (объем/объем) тетрагидрофурана). Аликвоту воды также подвергали процессу гидролиза и флуоресцентного мечения, как описано для образца гиалуронидазы, в качестве отрицательного контроля. Выделенные моносахариды разделяли методом RPLC с использованием октадецильной (Cis) обратнофазной колонки (4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм; JT Baker), детекцию осуществляли с помощью флуоресценции (возбуждение 360 нм, излучение 425 нм). Количественное определение содержания моносахаридов проводили сравнением хроматограмм образца гиалуронидазы с хроматограммой стандартов моносахаридов, включающих N-D-глюкозамин (GlcN), N-D-галактозамин (GalN), галактозу, фукозу и маннозу. В табл. 28 представлены молярные отношения каждого моносахарида к молекуле гиалуронидазы.

Таблица 28. Содержание моносахаридов в растворимой gHuPH20

партия	повторность	GlcN	GalN	галактоза	манноза	фукоза
HUB0701E	1	14,28	0,07*	6,19	25,28	2,69
	2	13,66	0,08*	6,00	24,34	2,61
	среднее	13,97	0,08*	6,10	24,81	2,65

Пример 17. С-концевая гетерогенность растворимой gHuPH20 из клеток 3D35M и 2B2.

Для sHuPH20 из партии, полученной и очищенной из клеток 3D35M в 100 л биореакторе (партия HUA0505MA), и партии, полученной из 2B2 клеток в 300 л биореакторе (партия HUB0701EB), провели определение С-концевой последовательности. Белки из каждой партии отдельно расщепляли эндопротеиназой Asp-N, которая специфически расщепляет пептидные связи с N-конца от аспарагиновой кислоты и цистеиновой кислоты. Расщепление привело к высвобождению С-концевой части растворимой gHuPH20, начиная с аспарагиновой кислоты в положении 431 из SEQ ID NO: 4. С-концевой фрагмент отделяли и характеризовали для определения последовательности и относительного содержания в партии HUA0505MA и партии HUB0701EB.

Было отмечено, что препараты растворимой gHuPH20 из клеток 3D35M и клеток 2B2 демонстрировали гетерогенность, то есть содержали полипептиды, которые отличались друг от друга по С-концевой последовательности (см. табл. 30 и 31). Такая гетерогенность, скорее всего, объясняется расщеплением экспрессируемого 447 аминокислотного полипептида (SEQ ID NO: 4) с С-конца пептидазами, присутствующими в культуральной среде или других растворах, применяемых в ходе получения и очистки белка. Полученные из препаратов растворимой gHuPH20 полипептиды имели аминокислотные последовательности, соответствующие аминокислотам 1-447, 1-446, 1-445, 1-444 и 1-443 последовательности растворимой gHuPH20, приведенной в SEQ ID NO: 122. Полные аминокислотные последовательности каждого из этих полипептидов приведены в SEQ ID NO: 122 - 126, соответственно. Как отмечено в табл. 29 и 30, содержание каждого полипептида в препаратах растворимой gHuPH20 из клеток 3D35M и 2B2 клеток отличается.

Таблица 29. Анализ С-концевых фрагментов из партии HUA0505MA

Фрагмент	А.-к. позиция (по SEQ ID NO: 4)	Последовательность	Теор. масса	Эксп. масса	Ошибка	Время элюции	Содержание
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:191)	2053,97	2054,42	0,45	99,87	0,2%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:192)	1890,91	1891,28	0,37	97,02	18,4%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:193)	1743,84	1744,17	0,33	86,4	11,8%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:194)	1630,70	1631,07	0,32	74,15	56,1%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502,70	1502,98	0,28	77,36	13,6%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405,64	Нет данных	Нет данных	Нет данных	0,0%

Таблица 30. Анализ С-концевых фрагментов из партии HUB0701EB

Фрагмент	А.-к. позиция (по SEQ ID NO: 4)	Последовательность	Теор. масса	Эксп. масса	Ошибка	Время элюции	Содержание
D28a	431-447	DAFKLPPMETEEPQIFY (SEQ ID NO:191)	2053,97	2054,42	0,45	99,89	1,9%
D28b	431-446	DAFKLPPMETEEPQIF (SEQ ID NO:192)	1890,91	1891,36	0,45	96,92	46,7%
D28c	431-445	DAFKLPPMETEEPQI (SEQ ID NO:193)	1743,84	1744,24	0,40	85,98	16,7%
D28d	431-444	DAFKLPPMETEEPQ (SEQ ID NO:194)	1630,70	1631,14	0,39	73,9	27,8%
D28e	431-443	DAFKLPPMETEEP (SEQ ID NO:195)	1502,70	1503,03	0,33	77,02	6,9%
D28f	431-442	DAFKLPPMETEE (SEQ ID NO:196)	1405,64	Нет данных	Нет данных	Нет данных	0,0%

Все изменения изобретения должны быть очевидны специалистам в данной области, но предполагается, что изобретение ограничено формулой изобретения.

В настоящем документе также предусмотрены все очевидные специалистам в данной области изменения изобретения, но предполагается, что изобретение ограничено формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения полипептида гиалуронидазы PH20, включающий культивирование клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу PH20, в условиях, обеспечивающих продуцирование гиалуронидазы PH20 в клетках, где указанная гиалуронидаза PH20 является растворимой и активной в нейтральной среде и выбрана из:

а) полипептида, состоящего из последовательности аминокислот 36-469, 36-470, 36-471, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 или 36-500 из SEQ ID NO: 107; и

б) полипептида, идентичного по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более полипептиду по п. а) и включающего только аминокислотные замены в последовательностях, указанных в п. а).

2. Способ по п.1, дополнительно включающий выделение продуцированного полипептида гиалуронидазы PH20.

3. Способ получения полипептида гиалуронидазы PH20, включающий культивирование клеток, содержащих вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу PH20, в условиях, обеспечивающих продуцирование указанной гиалуронидазы PH20 в клетках, причем указанная гиалуронидаза PH20 является растворимой и активной в нейтральной среде и выбрана из:

а) полипептида, состоящего из последовательности аминокислот 36-469, 36-470, 36-471, 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 или 36-500 из SEQ ID NO: 107; и

б) полипептида, идентичного по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более полипептиду по п. а) и включающего только аминокислотные замены в последовательностях, указанных в п. а).

4. Способ по п.3, дополнительно включающий выделение продуцированного полипептида гиалуронидазы PH20.

5. Способ по п.3 или 4, где нуклеиновая кислота, кодирующая гиалуронидазу PH20, содержит стоп-кодон, функционально встроенный непосредственно после кодона С-концевой аминокислоты.

6. Способ по любому из пп.1-5, где гиалуронидаза PH20 состоит из последовательности аминокислот 36-495, 36-496, 36-497, 36-498, 36-499 или 36-500 из SEQ ID NO: 107.

7. Способ по любому из пп.1-5, где гиалуронидаза PH20 состоит из последовательности аминокислот 36-469, 36-470 или 36-471 из SEQ ID NO:107.

8. Способ по любому из пп.1-7, где гиалуронидаза PH20 N-гликозилирована.

9. Способ по любому из пп.1-7, где гиалуронидаза PH20 содержит фрагмент N-ацетилглюкозамина, связанный по меньшей мере с тремя остатками аспарагина (N).

10. Способ по п.9, где три остатка аспарагина представляют собой аминокислотные остатки 235, 368 и 393 из SEQ ID NO: 107.

11. Способ по любому из пп.1-10, где гиалуронидаза PH20 модифицирована путем сиаилирования, альбуминирования, фарнезилирования, карбоксилирования, гидроксирования и/или фосфорилирования.

12. Способ по любому из пп.1-10, где гиалуронидаза PH20 модифицирована путем присоединения полимера.

13. Способ по п.12, в котором полимер представляет собой декстран или ПЭГ.

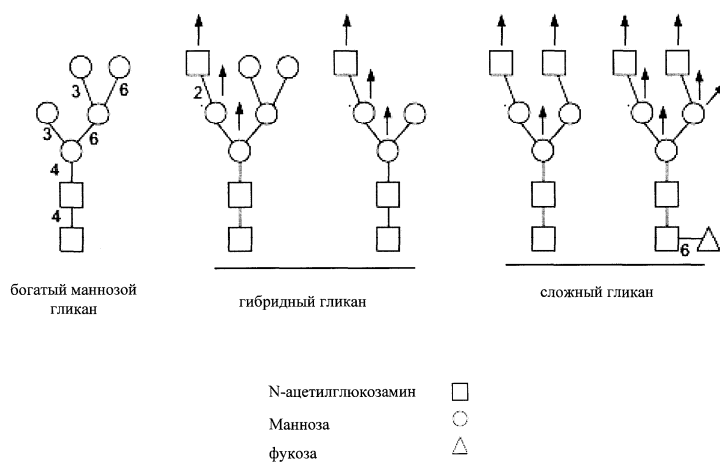
14. Способ по любому из пп.1-13, где клетка является эукариотической клеткой.

15. Способ по п.14, где эукариотическая клетка выбрана из клеток млекопитающих, клеток насекомых, маммализированных клеток насекомых, клеток дрожжей или клеток растений.

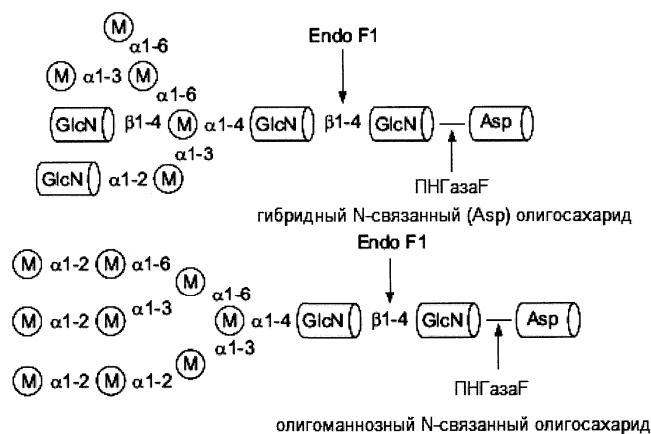
16. Способ по п.15, где клетка является клеткой CHO.

PH20 шимпанзе	MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSIQVFTFLLIPCCLTNFRAPPVIPNPFLWAWNAPSEFC	60
PH20 человека	MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSIQVFTFLLIPCCLTNFRAPPVIPNPFLWAWNAPSEFC	60
PH20 шимпанзе	LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTNNGGIPQKISL	120
PH20 человека	LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINVTGQDVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTNNGGIPQKISL	120
PH20 шимпанзе	QDHLDAKAKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNVQLS	180
PH20 человека	QDHLDAKAKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNVQLS	180
PH20 шимпанзе	LTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFN	240
PH20 человека	LTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFN	240
PH20 шимпанзе	VEIKRNDLSQLWNESTALYPSIYLNTOQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV	300
PH20 человека	VEIKRNDLSQLWNESTALYPSIYLNTOQSPVAATLYVRNRVQEAIRVSKIPDAKSPLPV	300
PH20 шимпанзе	FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIGTSLIMRSMKSCLLLDNYMET	360
PH20 человека	FVYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIGTSLIMRSMKSCLLLDNYMET	360
PH20 шимпанзе	ILNPYIINVTLAAMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK	420
PH20 человека	ILNPYIINVTLAAMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK	420
PH20 шимпанзе	PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLEKPPMETEESQI	480
PH20 человека	PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLEKPPMETEESQI	480
PH20 шимпанзе	FYNASPSTLSATMFI-VSILFLIISVASL	509
PH20 человека	FYNASPSTLSATMFDLCOLYLPISYLL	510

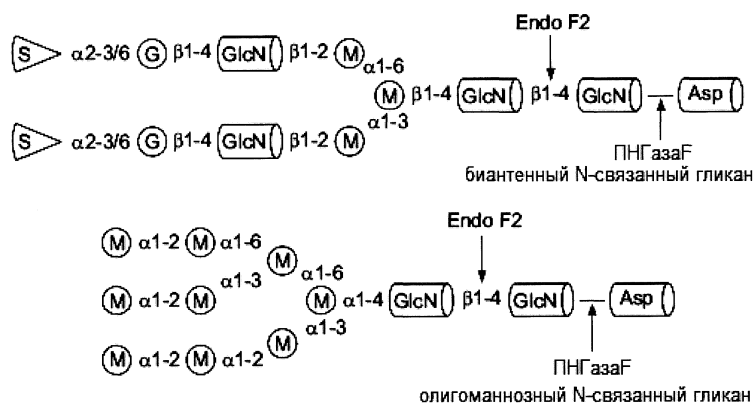
Фиг. 1



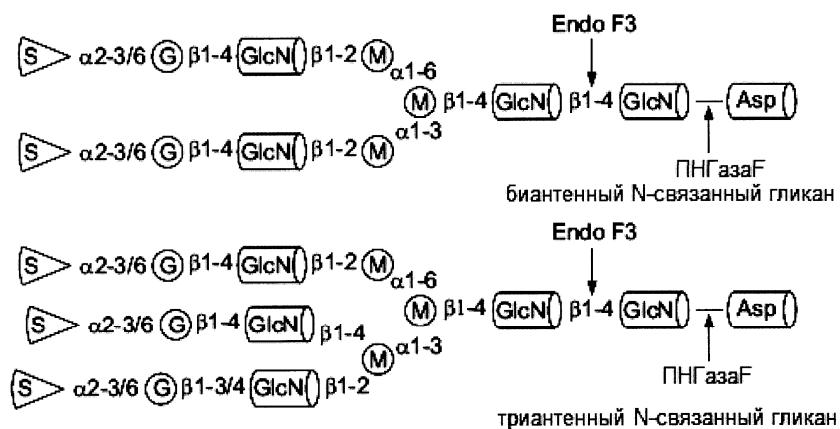
Фиг. 2



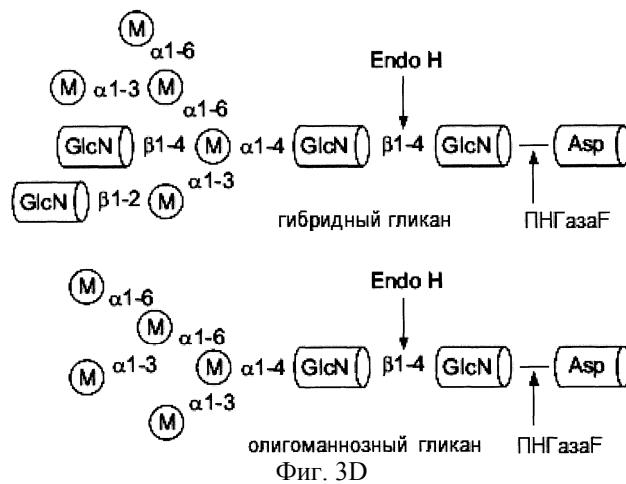
Фиг. 3А



Фиг. 3B



Фиг. 3C



Фиг. 3D

