

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034200**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.16

(51) Int. Cl. **C07K 14/435 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201591764

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(54) ВАРИАНТЫ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ТРЕТЬЕГО ТИПА (TIMP-3), КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(31) 61/782,613; 61/798,160; 61/802,988;
61/940,673

(32) 2013.03.14; 2013.03.15; 2013.03.18;
2014.02.17

(33) US

(43) 2016.02.29

(86) PCT/US2014/026811

(87) WO 2014/152012 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Сунь Дзеонгхоон, О'Нилл Джейсон
Чарльз, Кетчем Рэндал Р., Хехт Рэнди
Ира, Белуски Эдвард Дж., Майклз
Марк Лео (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) LANGTON KEVIN P. ET AL.: "Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 273, no. 27, 3 July 1998 (1998-07-03), pages 16778-16781, XP002417706, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.273.27.16778, Abstract, Figs. 1, 4-5, p. 16778, col. 2 li. 6-9, p. 16778 col. 2 li. 25-26, p. 16779 col. 1 li. 1-4, p. 16779 col. 1 li. 18-53, p. 16779 col. 2 li. 59-69, p. 16780 col. 1 li. 30-p, 16780 col. 2 li. 6, p. 16780 col. 2 li. 19-24, p. 16780 col. 2 li. 29-33, p. 16781 col. 12 li. 3-6

Anonymous: "Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Predicted) - TIMP3 - Rhinolophus ferrumequinum (Greater horseshoe bat)", 10 June 2008 (2008-06-10), XP055122276, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/B2KII1> [retrieved on 2014-06-10], the whole document

DATABASE UniProt [Online] 6 March 2013 (2013-03-06), "SubName: Full=Metalloproteinase inhibitor 3", XP002725522, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:L5KF25, Database accession no. L5KF25, the whole document

WO-A2-2008109433

EP-0648838

WO-A2-2007016482

(57) В изобретении раскрыты мутеины TIMP-3, варианты и производные, кодирующие их нуклеиновые кислоты и способы их получения и применения.

B1**034200****034200****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/782613, поданной 14 марта 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/798160, поданной 15 марта 2013 г., предварительной заявке на патент США № 61/802988, поданной 18 марта 2013 г., и предварительной заявке на патент США № 61/940673, поданной 17 февраля 2014 г., которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей, предоставленным в электронной форме. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла, озаглавленного A-1827WOPCT_SL31314, который был создан 11 марта 2014 г. и имеет размер 306 кбайт. Информация, содержащаяся в перечне последовательностей, предоставленном в электронной форме, включена в данный документ в полном объеме посредством ссылок.

Область техники

Настоящее изобретение, в общем, относится к ингибиторам металлопротеиназ. В частности, данное изобретение относится к тканевым ингибиторам металлопротеиназ-3 ("TIMP-3") и новым, приемлемым вариантам, мутеинам и их производным.

Уровень техники

Соединительные ткани и суставной хрящ поддерживаются в динамическом равновесии за счет обратных процессов синтеза и разрушения внеклеточного матрикса. Разрушение матрикса преимущественно обусловлено ферментативным действием металлопротеиназ, включая матриксные металлопротеиназы (ММР) и дисинтегрин-металлопротеиназы с повторами тромбоспондина (ADAMTS). Предполагается, что, в то время как данные ферменты являются необходимыми для многих биологических процессов (включая развитие, морфогенез, перестройку костей, заживление ран и ангиогенез), нарушение регуляции данных ферментов, приводящее к их повышенному уровню, провоцирует болезни соединительной ткани, включающие ревматоидный артрит и остеоартрит, а также рак и сердечно-сосудистые заболевания.

Эндогенные ингибиторы металлопротеиназ включают альфа-2-макроглобулин и тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP), четыре из которых, как известно, кодируются в человеческом геноме. TIMP-3 ингибирует все основные металлопротеиназы, разрушающие хрящи, и многочисленные данные свидетельствуют о его способности защищать хрящи. Включение белка в хрящевые эксплантаты предотвращает цитокин-индуцированное разрушение, а внутрисуставные инъекции снижают хрящевое разрушение в модели остеоартрита медиального разрыва мениска у крыс.

Нарушение регуляции ММР также происходит при застойной сердечной недостаточности и, как предполагается, играет важную роль в многочисленных провоспалительных процессах. Однако разработка TIMP-3 в качестве терапевтического ингибитора активности ММР затруднена в связи со сложностью производства рекомбинантного белка и коротким периодом полураспада рекомбинантных форм TIMP-3. Соответственно в данной области техники существует потребность получения форм TIMP-3, которые обладают необходимыми характеристиками для синтеза, очистки, а также фармакокинетическими/фармакодинамическими свойствами.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 проиллюстрировано выравнивание нативного полноразмерного человеческого TIMP-3 и мутированной формы полноразмерного человеческого TIMP-3, в котором буква "X" замещена на конкретные аминокислоты в последовательности. Сигнальная последовательность подчеркнута, другие сигнальные последовательности могут быть замещены соответственно, как описано в данном документе.

На фиг. 2 проиллюстрировано выравнивание нативного полноразмерного человеческого TIMP-3 и варианта TIMP-3, в которых были осуществлены определенные замещения аминокислот. Сигнальная последовательность представлена и подчеркнута для последовательности нативного полноразмерного TIMP-3 для поддержания закономерности нумерации; другие сигнальные последовательности могут быть замещены соответственно, как описано в данном документе.

На фиг. 3 проиллюстрирована двумерная полипептидная карта, в которой аминокислоты упорядочены для определения тех остатков, что включают N-домен TIMP-3 (остатки 23-143) и С-домен (144-211), а также положение цистеина, что формирует дисульфидные связи.

На фиг. 4 проиллюстрировано выравнивание нативного человеческого N-концевого TIMP-3 и мутированной формы человеческого N-концевого TIMP-3, в котором буква "X" замещена на конкретные аминокислоты в последовательности. Сигнальная последовательность подчеркнута, другие сигнальные последовательности могут быть замещены соответственно, как описано в данном документе. Определенные замены предусмотрены в зрелой форме N-концевого TIMP-3 и обозначены в данном документе как "n # m", где "n" обозначает аминокислоту, найденную в нативном N-концевом домене TIMP-3, "# " обозначает номер аминокислотных остатков и "m" обозначает аминокислоту, которая была замещена ("-" указывает, что аминокислота была удалена). Так, например, "K45I" означает, что лизин (K) при аминокислоте 45 был замещен на изолейцин (I). Удаление M67 обозначается M67-. Замена остатков 71-77 парой остатков глицина обозначено как Y70-GG-H78. Мутированные формы человеческого TIMP-3, при-

веденные в данном документе в качестве примеров, содержат следующие мутации (отдельно или в комбинации): R43F, K45I, K45T, K53T, E54Y, K65T, M67-, K68T, K68I, Y70-GG-H78, H78W. Специфические комбинации мутаций включают K45I, K53T, E54Y, K65T, M67-, K68T; K45I, K53T, E54Y, M67-, K68I; K45I, K53T, K65T, M67-, K68T; K45I, K53T, M67-, K68I; K45I, K53T, M67-, K68I, H78W; K45I, K65T, K68I; K45I, K65T, M67-, K68T; K45I, K65T, M67-, K68T, H78W; K45I, M67-, K68I, H78W; K45I, M67-, K68T; K45T, K65T, M67-, K68I; K45T, K65T, M67-, K68T; K53T, E54Y; K53T, H78W; R43F, K45I, K65T, K68I.

На фиг. 5 проиллюстрировано выравнивание нативного человеческого N-концевого TIMP-3 и мутированной формы человеческого N-концевого TIMP-3, в котором буква "X" замещена на конкретные аминокислоты в последовательности. Сигнальная последовательность подчеркнута, другие сигнальные последовательности могут быть замещены соответственно, как описано в данном документе. Определенные замены предусмотрены в зрелой форме N-концевого TIMP-3 и обозначены в данном документе как "n#m", где "n" обозначает аминокислоту, найденную в нативном N-концевом домене TIMP-3, "#" обозначает номер аминокислотных остатков и "m" обозначает аминокислоту, которая была замещена ("-" указывает, что аминокислота была удалена). Так, например, "K45E" означает, что лизин (K) при аминокислоте 45 был замещен на глутамин (E). Мутированные формы человеческого TIMP-3, приведенные в данном документе в качестве примеров, содержат следующие мутации (отдельно или в комбинации): T25G; T25H; T25K; T25P; T25R; T25S; T25W; C26A; S27V; S27A; P28A; P28D; P28L; P28S; S29I; H30A; P31A; Q32A; F35A; C36A; N37A; D39A; V41A; I42A; R43A; R43E; R43T; K45E; V46A; G48A; G48S; K49S; K49E; L51E; L51T; K53D; E54S; P56N; L60I; V61Q; T63E; T74E; H78D; H78E; Q80E; G116T; C118A; N119D; C143A и I44N-. Специфические комбинации мутаций включают S27V S29I; V46A G48S K49E L51E K53D E54S P56N L60I V61Q G116T N119D; C26A C118A; C36A C143A; K45E K49E; K45E K49S; K45E Q80E; K45E T63E; K45E T63E H78E; K45E T63E H78E Q80E; L51T T74E H78D; R43E T74E H78D Q80E; R43T T74E H78D Q80E; T63E H78D; T63E H78E; T63E H78E Q80E; T63E T74E H78D; T63E T74E H78E; T74E H78D Q80E; T74E H78E Q80E; Y70-GG-H78N.

На фиг. 6 проиллюстрировано выравнивание нативного TIMP-2 и нативного TIMP-3. Идентификация аминокислот в соответствующем остатке обозначена звездочкой под последовательностями.

Сущность изобретения

В одном варианте осуществления изобретения представлен выделенный мутеин TIMP-3, имеющий зрелый участок, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична зрелому участку TIMP-3, представленному в SEQ ID NO:2, имеющий по меньшей мере одну мутацию, при этом мутация выбрана из группы, состоящей из K45E; K45N; K45S; V47T; K49N; K49E; K49S; K50N; L51T; L51N; V52T; K53T; P56N; F57N; G58T; T63E; T63N; K65T; K65N; M67T; K68S; T74E; K75N; P77T; H78D; H78E; H78N; Q80E; Q80T; K94N; E96T; E96N; V97N; N98T; K99T; D110N; K112T; Q126N; K133S; R138T; R138N; H140T; T158N; K160T; T166N; M168T; G173T; H181N; A183T; R186N; R186Q; R186E; K188T; K188Q; K188E; P201N; K203T; I205F, I205Y, A208G, A208V и A208Y.

В другом варианте осуществления изобретения представлен выделенный мутеин TIMP-3, имеющий зрелый участок, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична зрелому участку TIMP-3, представленному в SEQ ID NO:2, имеющий мутацию F57N и по меньшей мере одну дополнительную мутацию, причем мутация представляет собой замещение в одном или более остатков K TIMP-3. В дополнительном аспекте изобретения дополнительная мутация вводит N-связанный сайт гликозилирования в аминокислотную последовательность.

Также вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный мутеин TIMP-3, имеющий зрелый участок, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична зрелому участку TIMP-3, представленному в SEQ ID NO:2, причем мутеин имеет по меньшей мере одну мутацию, что вводит по меньшей мере один N-связанный сайт гликозилирования в аминокислотную последовательность. В дополнительном варианте осуществления изобретения мутеин TIMP-3 имеет один, два, три, четыре, пять или шесть N-связанных сайтов гликозилирования; в еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения количество введенных N-связанных сайтов гликозилирования представляет собой семь, восемь, девять или десять.

В одном варианте осуществления изобретения N-связанный сайт гликозилирования введен в участок аминокислотной последовательности TIMP-3, выбранной из группы, состоящей из следующего: участок, содержащий аминокислоты 48-54; участок, содержащий аминокислоты 93-100; участок, содержащий аминокислоты 121-125; участок, содержащий аминокислоты 143-152; аминокислоты 156-164; участок, содержащий аминокислоты 183-191, и их комбинации. В дополнительном варианте осуществления изобретения мутеин TIMP-3 имеет два, три, четыре или пять N-связанных сайтов гликозилирования; в дополнительном варианте осуществления изобретения количество введенных N-связанных сайтов гликозилирования представляет собой шесть, семь, восемь, девять или десять.

Дополнительно представлен выделенный мутеин TIMP-3, имеющий зрелый участок, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична зрелому участку TIMP-3, представленному в SEQ ID NO:2, причем мутеин имеет по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из: (a) одной или более мутаций в поверхностном положительно заряженном участке

ТИМР-3, которые приводит к изменению характеристик заряженного участка ТИМР-3, что имитирует заряженную поверхность ТИМР-2; (b) одной или более мутаций, что снижают чувствительность к протеолитическому расщеплению; (c) одной или более мутаций, что приводят к снижению взаимодействия мутеина ТИМР-3 с фагоцитарным рецептором LRP-1; (d) одной или более мутаций, что приводят к снижению взаимодействия гепарина мутеина ТИМР-3 или компонентов внеклеточного матрикса; (e) присоединения одного или более остатков цистеинила к последовательности природного ТИМР-3; (f) улучшения фармакокинетических и/или фармакодинамических свойств и (g) комбинаций мутаций, описанных под (a)-(f). В одном варианте осуществления изобретения мутацию или мутации вводят в участок аминокислотной последовательности ТИМР-3, выбранной из группы, состоящей из следующего: участок, содержащий аминокислоты 48-54; участок, содержащий аминокислоты 93-100; участок, содержащий аминокислоты 121-125; участок, содержащий аминокислоты 143-152; аминокислоты 156-164; участок, содержащий аминокислоты 183-191; и их комбинации.

В одном аспекте изобретения представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутеин ТИМР-3 по любому одному вышеупомянутому мутеину ТИМР-3. Другие аспекты изобретения представляют вектор экспрессии, содержащий такую выделенную нуклеиновую кислоту; выделенную клетку-хозяина, трансформированную или трансфицированную вектором экспрессии; и способ получения рекомбинантного мутеина ТИМР-3, который включает культивирование трансформированной или трансфицированной клетки-хозяина в условиях, которые способствуют экспрессии мутеина ТИМР-3 и выделению мутеина ТИМР-3.

Дополнительно представлена композиция, содержащая мутеин ТИМР-3, описанный в данном документе, а также способ лечения состояния, в котором матриксные металлопротеиназы (ММП) и/или другие протеиназы являются ингибируемыми или ингибируются ТИМР-3, играя причинную или усугубляющую роль, включающий введение субъекту, страдающему таким заболеванием, количества данной композиции, необходимого для лечения данного состояния.

В одном варианте осуществления изобретения состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительных состояний, остеоартрита, ишемии миокарда, реперфузионного повреждения и развития застойной сердечной недостаточности. В одном варианте осуществления изобретения состояние выбирают из группы, содержащей астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ) и идиопатический фиброз легких (IPF), воспалительное заболевание кишечника (например, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона и целиакия), псориаз, миокардит, включая вирусный миокардит, воспаления, связанного с атеросклерозом, и артритов, включая ревматоидный артрит и псориатический артрит.

В дополнительном варианте осуществления изобретения состояние выбирают из группы, содержащей дистрофический буллезный эпидермолиз, остеоартрит, синдром Рейтера, псевдоподагру, ревматоидный артрит, включая ювенильный ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, склеродермию, заболевание периодонта, язву, включающая язву роговицы, эпидермиса или желудка, заживление ран после операций, рестеноз, эмфизему, болезнь Педжета, остеопороз, склеродермию, компрессионную атрофию кости или тканей (при пролежнях), холестеатому, патологическое заживление ран, ревматоидный артрит, ревматоидный полиартрит, начало системного ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (серонегативность, энтезопатия, артропатический синдром), дерматомиозит, псориатический артрит, склеродермию, системную красную волчанку, васкулиты, миозит, полимиозит, дерматомиозит, остеоартрит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическую полимиалгию, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, псориатическая эритродермия, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанку, болезнь Стилла, системную красную волчанку (СКВ), тяжелую псевдопаралитическую миастению, воспалительное заболевание кишечника, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, целиакию (болезнь глютеновой недостаточности), энтеропатии, связанные с серонегативными артропатиями, микроскопический или коллагеновый колит, эозинофильный гастроэнтерит или резервуарный илеит, возникающий после проктоколэктомии и повздошно-анального анастомоза, панкреатит, инсулинзависимый сахарный диабет, мастит, холецистит, холангит, перихолангит, рассеянный склероз (РС), астму (в том числе экзогенную и эндогенную астму, а также связанные с ними хронические воспалительные заболевания или гиперчувствительность дыхательных путей), хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ, например, хронический бронхит, эмфизема), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), респираторный дистресс-синдром, муковисцидоз, легочную гипертензию, легочную вазоконстрикцию, острое повреждение легких, аллергический бронхолегочный аспергиллез, гиперсенситивный пневмонит, эозинофильную пневмонию, бронхит, аллергический бронхит, бронхоэктатическую болезнь, туберкулез, аллергический пневмонит, профессиональную астму, астму, как расстройство, саркоид, реактивную болезнь (или дисфункцию) дыхательных путей, биссиноз, интерстициальную болезнь легких, гиперэозинофильный синдром, ринит, синусит, паразитарные болезни легких, гиперреактивность дыхательных путей, вызванная вирусами (например, респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом парагриппа (PIV), риновирусами (RV) и аденовирусами), болезнь Гийена-Барре, болезнь Грейвса, болезнь Аддисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, реакцию

трансплантат против хозяина (РТПХ), церебральную ишемию, черепно-мозговую травму, рассеянный склероз, невропатию, миопатию, повреждение спинного мозга и боковой амиотрофический склероз (БАС).

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении представлены композиции, наборы и способы, относящиеся к полипептидам TIMP-3, вариантам, производным и мутеинам. Также представлены нуклеиновые кислоты и их производные и фрагменты, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующие в целом или частично такие полипептиды TIMP-3, варианты, производные или мутеин, например нуклеиновую кислоту, кодирующую все или часть таких полипептидов TIMP-3, вариантов, производных или мутеинов; плазмиды и векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки или клеточные линии, включающие такие нуклеиновые кислоты и/или векторы и плазмиды. Представленные способы включают, например, способы получения, определения и выделения полипептидов TIMP-3, вариантов, производных или мутеинов, что проявляют необходимые свойства.

Существует множество состояний, для которых является целесообразным повышение уровня эндогенного TIMP-3 у млекопитающих или снижение уровня TIMP-3 в определенных тканях. Таким образом, в данном документе представлены способы получения композиций, таких как фармацевтических композиций, содержащих полипептид TIMP-3, вариант, производное или мутеин, и способ введения композиции, содержащей полипептид TIMP-3, вариант, производное или мутеин субъекту, например субъекту, страдающему состоянием, при котором нарушение регуляции активности матриксной металлопротеиназы приводит к чрезмерному или ненадлежащему ремоделированию ткани.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается обычным специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Необходимо отметить, что единственные формы слов включают ссылки на множественные, если только в контексте прямо не указывается иное. В основном используемая номенклатура и методики культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белка и нуклеиновых кислот, и гибридизации, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Если не указано иное, способы и методики по настоящему изобретению, как правило, выполнены в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и согласно описанию в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании; см., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), который включен в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя согласно общепринятым требованиям или описанию в данном документе. Терминология, использованная в данном документе, и лабораторные методы и методики аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известными и широко используются в данной области техники. Стандартные методики могут использоваться для химического синтеза, химических анализов, фармацевтического препарата, состава и доставки, и лечения пациентов.

В данном документе считается, что следующие термины несут значения, приписываемые им, если не указано иное.

Термин "выделенный", используемый для определения молекулы (молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид или антитело), указывает, что молекула в силу своего происхождения или источника получения (1) не связана с природно-ассоциированными компонентами, которые связаны с ней в природном состоянии, (2) является, по существу, свободной от других молекул того же вида, (3) экспрессируется клетками различных видов или (4) не встречается в природе без вмешательства человека. Таким образом, химически синтезированная молекула или синтезированная в клеточных системах отличается от клетки, которая является ее природным источником, будет "выделена" из природно-ассоциированных с ней компонентов. Также в процессе выделения молекула практически не содержит природно-ассоциированных компонентов за счет использования методов очистки, хорошо известных в данной области техники. Чистота и гомогенность молекулы может быть проанализирована с помощью ряда способов, хорошо известных в данной области. Например, чистота образца полипептида может быть определена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. В некоторых случаях более высокая степень разделения может быть обеспечена при использовании ВЭЖХ или других способов очистки, хорошо известных в данной области техники.

Каждый термины "пептид", "полипептид" и "белок" относятся к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Данные термины охватывают, например, природные и искусственные белки, фрагменты белков и аналоги полипептидов (например, мутеины, варианты и гибридные белки) белковой последовательности, а также посттрансляционно и ковалентно

или нековалентно модифицированные белки. Пептид, полипептид или белок может быть мономерным или полимерным.

Термин "фрагмент полипептида", используемый в данном документе, относится к полипептиду, который содержит аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию по сравнению с соответствующим полноразмерным белком. Длина фрагментов может быть, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот. Длина фрагментов также может быть не более чем 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот. Фрагмент может дополнительно содержать по меньшей мере в одном или в обоих концах одну или более дополнительных аминокислот, например последовательность аминокислот с другого природного белка (например, домен Fc или лейциновой молнии) или искусственную последовательность аминокислот (например, последовательность искусственного линкера или маркерный белок).

"Вариант" или "мутеин" полипептида (например, вариант или мутеин TIMP-3) включает аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков вставлен, удален из и/или замещен в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. Варианты настоящего изобретения включают гибридные белки.

"Консервативное замещение аминокислоты" представляет собой замещение, которое существенно не изменяет структурные характеристики родительской последовательности (например, замена аминокислоты не приводит, как правило, к разрушению спирали, которое происходит в родительской последовательности, или к разрушению других типов вторичной структуры, что свойственно для родительской последовательности, или является необходимым для ее функциональности). Примеры вторичных и третичных структур полипептидов, известных в данной области техники, описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991), которые включены в данный документ посредством ссылок.

Один из способов определения степени сходства варианта или мутеина с нативным белком представляет собой сравнение процента идентичности между двумя (или более) полипептидными последовательностями или нуклеиновыми кислотами, кодирующими последовательность. "Процент идентичности" двух полинуклеотидов или двух полипептидных последовательностей определяют путем сравнения последовательностей с использованием компьютерной программы GAP (часть GCG Wisconsin Package, v10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) с учетом ее параметров по умолчанию.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, полипептид TIMP-3, вариант или мутеин), который был химически модифицирован, например, с помощью конъюгации с другим химическим фрагментом (таким как, например, полиэтиленгликоль или альбумин, например человеческий сывороточный альбумин), фосфорилирования и/или гликозилирования.

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности указаны с использованием стандартных одно- или трехбуквенных аббревиатур. Если не указано иное, каждая полипептидная последовательность имеет концевую аминогруппу слева и концевую карбоксигруппу справа; каждая одноцепочечная последовательность нуклеиновой кислоты и верхняя цепь каждой последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты имеет 5'-конец слева и 3'-конец справа. Конкретная полипептидная или полинуклеотидная последовательность также может быть описана с объяснением отличия от эталонной последовательности. Например, замещения аминокислот обозначены здесь как "n # m", где "n" обозначает аминокислоту, обнаруженную в нативном полноразмерном полипептиде, "#" обозначает номер аминокислотных остатков и "m" обозначает замещенные аминокислоты.

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используют взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов (например, пептидные нуклеиновые кислоты и не встречающиеся в природе нуклеотидные аналоги) и их гибриды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной. В одном варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот по изобретению содержат непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид TIMP-3, фрагмент, вариант, производное или мутеин согласно изобретению. Два одноцепочечных полинуклеотида являются "комплементарными" друг другу, если их последовательности могут быть выровнены в направлении против параллельной ориентации таким образом, что каждый нуклеотид в первом полинуклеотиде занимает положение напротив своего комплементарного нуклеотида во втором полинуклеотиде без введения делеций и без непарных нуклеотидов в 5'- или 3'-конце каждой последовательности. Полинуклеотид "комплементарный" другому полинуклеотиду, если оба полинуклеотида могут гибридизоваться друг с другом в умеренно жестких условиях. Таким образом, полинуклеотид может быть комплементарным другому полинуклеотиду, не являясь его компонентом.

"Вектор" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая может быть использована для введения другой нуклеиновой кислоты, связанной с ней, в клетку. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к линейной или кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный век-

тор (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть введены в геном вируса. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, включающие бактериальный источник репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым реплицируются вместе с геномом хозяина. "Вектор экспрессии" является типом вектора, который может направлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

Нуклеотидная последовательность является "функционально связанной" с регуляторной последовательностью, если регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, время, или локализацию экспрессии) нуклеотидной последовательности. "Регуляторная последовательность" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, время или локализацию) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Регуляторная последовательность может, например, влиять непосредственно на регулирующую нуклеиновую кислоту или под действием одного или более других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуляторной последовательностью и/или нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Другие примеры регуляторных последовательностей описаны, например, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA и Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

Природные внеклеточные белки, как правило, включают "сигнальную последовательность", которая направляет белок в клеточный путь для секреции белка и который не присутствует в зрелом белке. Сигнальная последовательность может также называться "сигнальный пептид" или "лидерный пептид" и ферментативно отщепляться от внеклеточного белка. Белок, полученный подобным образом (т.е. после удаления сигнальной последовательности), часто называется "зрелым" белком. Полинуклеотид, кодирующий белок или полипептид согласно изобретению, может кодировать природную сигнальную последовательность или гомологическую сигнальную последовательность, многие из которых известны в данной области техники.

Как понятно специалисту в данной области техники, рекомбинантные белки или полипептиды в соответствии с настоящими вариантами осуществления изобретения могут быть экспрессированы в клеточные линии, в том числе клеточные линии млекопитающих. Последовательности, кодирующие специфические белки, могут быть использованы для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего. Трансформация может проводиться любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, в том числе, например, упаковкой полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукцию клетки-хозяина вирусом (или вектором) или методиками, известными в данной области техники, как представлено в качестве примера в патентах США №№ 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (данные патенты включены в данный документ в качестве ссылки). Применяемая методика трансформации зависит от хозяина для трансформации. Способы введения гетерологических полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстранопосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядро.

"Клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая может быть использована для экспрессии нуклеиновой кислоты, например нуклеиновой кислоты по изобретению. Клетка-хозяин может являться прокариотом, например *E. coli*, или эукариотом, например одноклеточным эукариотом (например, дрожжи или другие грибы), растительной клеткой (например, растительная клетка табака или томата), клеткой животных (например, человеческая клетка, клетка обезьяны, клетка хомяка, клетка крысы, клетка мыши или клетка насекомого) или гибридомой. Примеры клеток-хозяев включают клеточную линию COS-7 почек обезьян (ATCC CRL 1651) (см. Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), L-клетки, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичников китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Vегgie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в среде без сыворотки (см. Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31) или CHO штамма DX-B11, который является дефектным по DHFR (см. Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), клетки HeLa, клеточные линии BHK (ATCC CRL 10), линии клеток CV1/EBNA получены из клеточной линии почек CV1 (ATCC CCL 70) африканских зеленых обезьян (см. McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821), эмбриональных клеток почек человека, таких как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальных клеток человека A431, клеток человека Colo205, других трансформированных клеточных линий приматов, нормальных диплоидных клеток, клеточных штаммов, полученных из культуры первичной ткани *in vitro*, первичных эксплантов, клеток HL-60, U937, HaK или Jurkat.

Как правило, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которую могут трансформировать или трансфицировать нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, которая затем может экспрессироваться в клетке-хозяине. При "временной трансфекции" нуклеиновая кислота вводится в

клетку-хозяина по одному из нескольких способов, известных в данной области техники, и рекомбинантный белок экспрессируется до конечного периода времени, обычно до около четырех дней, прежде чем нуклеиновая кислота удаляется или разрушается, например когда клетка-хозяин подвергается митозу. Если "стабильная трансфекция" является желательной, кодирующая полипептид нуклеиновая кислота может быть введена в клетку-хозяина вместе с нуклеиновой кислотой, кодирующей селективный маркер. Использование селективного маркера позволяет специалисту в данной области техники идентифицировать трансфицированные клетки-хозяева, в которых полипептид-кодирующая нуклеиновая кислота интегрирована в геном клетки-хозяина таким образом, что полипептид-кодирующая нуклеиновая кислота поддерживается путем митоза и может экспрессироваться в клетках потомства.

Понятие "рекомбинантная клетка-хозяин" может быть использовано для обозначения клетки-хозяина, трансформированной или трансфицированной нуклеиновой кислотой, которая должна экспрессироваться. Клетка-хозяин также может представлять собой клетку, что включает нуклеиновую кислоту, но не экспрессирует ее на необходимом уровне, если регуляторная последовательность не будет введена в клетку-хозяина таким образом, что она становится функционально связанной с нуклеиновой кислотой. Установлено, что термин клетка-хозяин относится не только к определенной клетке, но и к потомству или возможному потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить некоторые модификации вследствие, например, мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включается в объем термина, который используется в данном документе.

"ДНК TIMP-3", "TIMP-3-кодирующая ДНК" и сходные термины, используемые в данном документе, указывают на выбранную TIMP-3-кодирующую нуклеиновую кислоту, в которой TIMP-3, который экспрессируется из нее, может быть как нативным TIMP-3, так и вариантом TIMP-3 или мутеином, как описано в данном документе. Кроме того, "TIMP-3", "белок TIMP-3" и "полипептид TIMP-3" используются для обозначения как нативного белка TIMP-3, так и белка TIMP-3, содержащего одну или более мутаций (т.е. полипептид TIMP-3, вариант, производное или мутеин). Определенный мутеин TIMP-3 может быть определен с помощью мутации или мутаций, например "K45N TIMP-3" или "K45N полипептид TIMP-3" обозначает полипептид, в котором лизин (K) у аминокислоты 45 нативного TIMP-3 был замещен на аспарагин (N).

Термин "нативный TIMP-3", используемый в данном документе, относится к TIMP-3 дикого типа. TIMP-3 экспрессируется в различных клетках и тканях млекопитающих и присутствует во внеклеточном матриксе; TIMP-3, что экспрессируется таким образом, упоминается в данном документе как "эндогенный" TIMP-3. Аминокислотная последовательность TIMP-3 и последовательность нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующая TIMP-3, описаны в патенте США 6562596, выданном 13 мая 2003 г., раскрытие которого включено в данное описание путем ссылок. Система нумерации аминокислот, используемая в патенте США 6562596, обозначает аминокислоты в сигнальном (или лидерном) пептиде отрицательными числами, а также указывает на зрелый белок (т.е. белок, из которого был удален сигнальный или лидирующий пептид) как аминокислоты 1-188. Системы нумерации, используемые в данном документе, относятся к первой аминокислоте нативного лидерного пептида TIMP-3, обозначенной # 1; таким образом, полноразмерный TIMP-3 содержит аминокислоты 1-211, а зрелая форма представляет собой аминокислоты 24-211. Рядовым специалистам в данной области техники понятно различие в нумерации аминокислот, которые могут возникнуть при использовании этих различных систем нумерации, и, таким образом, могут легко применять систему нумерации, используемую в данном документе, например полипептид TIMP-3, в котором первая аминокислота зрелой формы упоминается как #1. Таким образом, например, обозначенный в данном документе K45N будет обозначен как K22N при использовании системы нумерации патента США 6562596.

TIMP-3 состоит из двух доменов, N-концевого домена, содержащего аминокислоты TIMP-3 от 24 по 143 (т.е. около двух третей молекулы), и С-концевого домена, который содержит аминокислоты от 144 до 211. На фиг. 3 проиллюстрирован двухмерный полипептидный анализ TIMP-3, указывающий на сложную природу дисульфидных связей, способствующих формированию вторичной и третичной структуры TIMP-3. Установлено, что N-концевой домен TIMP-3, часто называемый "N-TIMP-3," обладает, по меньшей мере, некоторыми биологическими свойствами TIMP-3; соответственно варианты TIMP-3, производные и мутеины, описанные в данном документе, включают варианты, производные и мутеины фрагмента TIMP-3, содержащие N-концевой домен.

Применение нативного белка TIMP-3 в качестве терапевтической молекулы усложняется в связи с некоторыми факторами. Например, при использовании стандартных методик экспрессии у млекопитающих титры экспрессии белка TIMP-3 являются достаточно низкими для получения достаточного количества TIMP-3 в количестве, необходимом для терапевтического белка. Кроме того, связывание TIMP-3 с внеклеточным матриксом предопределяет необходимость внесения гепарина (или аналогичного вещества, снижающего связывание TIMP-3 с внеклеточным матриксом) в среду для культивирования клеток и связывание с фагоцитарным белком липопротейна низкой плотности рецептор-опосредованного белка 1 (LRP1) снижает стимуляцию секреции рекомбинантного TIMP-3 в среду на уровне, необходимом для разработки масштабного технологического процесса. Микробный синтез полноразмерного TIMP-3 в

клетках прокариот усложнялся в связи с ненадлежащим фолдингом белка.

Таким образом, для решения одной или более из этих проблем варианты были модифицированы TIMP-3 или мутеины по данному изобретению. Полипептиды по данному изобретению содержат полипептиды, которые были модифицированы любым способом и по любой причине, например для: (1) снижения чувствительности к протеолизу, (2) снижения чувствительности к окислению, (3) снижения потребности в агентах, ингибирующих связывание TIMP-3 с внеклеточным матриксом в клеточной культуре, (4) изменения аффинности связывания других фрагментов, например фагоцитарных рецепторов, таких как LRP-1, (5) придания или модификации других физико-химических или функциональных свойств, в том числе фармакокинетических и/или фармакодинамических, (6) облегчения экспрессии и/или очистки рекомбинантного белка. Аналоги включают мутеины полипептида. Например, замещение одной или более аминокислот (например, замещение консервативных аминокислот) могут быть проведены в нативной последовательности (например, в части полипептида вне домена(ов), образующего(щих) межмолекулярные контакты). Консенсусные последовательности могут быть использованы для выбора аминокислотных остатков для замещения; специалисты в данной области техники признают, что дополнительные аминокислотные остатки могут быть также замещены.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен мутеин TIMP-3 или вариант, который будет проявлять уровни экспрессии мутеина или варианта выше по сравнению с нативным TIMP-3; в другом аспекте настоящего изобретения повышенная экспрессия происходит в системе экспрессии клеток млекопитающих. Уровни экспрессии могут быть определены любым подходящим способом, который позволит количественно или полуколичественно определить количество рекомбинантного TIMP-3 (нативный, вариант или мутеин) в клеточной культуральной надосадочной жидкости, т.е. кондиционированной среде (CM). В одном варианте осуществления изобретения образцы или CM оценивают с помощью вестерн-блоттинга; в другом варианте осуществления изобретения образцы или CM оценивают с использованием стандартного метода анализа человеческого TIMP-3 ELISA.

В одном варианте осуществления изобретения увеличение экспрессии наблюдается в системе временной экспрессии; в другом варианте осуществления изобретения увеличение экспрессии наблюдается в стабильной системе трансфекции. Один вариант осуществления изобретения предусматривает мутеин TIMP-3 или вариант, для которого увеличение экспрессии наблюдается в два раза (2×) выше по сравнению с нативным TIMP-3; другой вариант осуществления изобретения предусматривает мутеин TIMP-3 или вариант, для которого увеличение экспрессии наблюдается в пять раз (5×) выше по сравнению с нативным TIMP-3. Дополнительные варианты осуществления изобретения включают мутеины TIMP-3 или варианты, для которых увеличение экспрессии наблюдается в три раза (3×), в четыре раза (4×) или шесть раз (6×). В одном варианте осуществления изобретения экспрессия мутеина TIMP-3 или варианта в десять раз (10×) больше по сравнению с нативным TIMP-3; в другом варианте осуществления изобретения наблюдаемая экспрессия выше чем в 10 раз, например в 20 раз (20×) или выше, по сравнению с нативным TIMP-3.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены мутеины TIMP-3 (или варианты), для которых введения гепарина в среду для культивирования клеток может быть сниженным (или другого агента, ингибирующего связывание TIMP-3 с внеклеточным матриксом). Уменьшение количества гепарина (или другого агента) может быть описано полуколичественным образом, т.е. уменьшение может быть частичным, умеренным, существенным или полным. В другом варианте осуществления изобретения уменьшение выражено в процентах, например, количество гепарина (или подобного агента) может быть уменьшено на 10, 20, 30, 40, 50% или более (например, на 60, 70, 80, 90 или 100%).

В одном варианте осуществления изобретения предусмотрены варианты TIMP-3 или мутеины, содержащие вставленные сайты гликозилирования. Как известно в данной области техники, характер гликозилирования может зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия определенных остатков гликозилирования аминокислот, рассматриваемых ниже) или клетки-хозяина, или организма, в котором вырабатывается белок. Конкретные системы экспрессии рассматриваются ниже. Наличие, отсутствие или степень гликозилирования могут быть определены любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая полуколичественное определение сдвига молекулярной массы (MW) при измерении с помощью вестерн-блоттинга или окрашивания кумасси гелей SDS-PAGE, в то время как количественные показатели могут включать использование методов масс-спектрофотометрии и измерение сдвига MW соответственно с введением аспарагин-сшитого гликозилирования, или путем измерения сдвига слоя за счет удаления аспарагин-сшитого гликозилирования ферментом, таким как пептид-N-гликозидаза F (PNGase-F; SigmaAldrich, St. Louis, MO).

Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного остатка к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин (NXS) и аспарагин-X-треонин (NXT), где X обозначает любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного остатка к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирова-

ния. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто серина или треонина, в то время как также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксизисин.

В целях удобства добавление сайтов гликозилирования в антиген-связывающий белок осуществляется путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть проведено путем добавления или замещения одного или более остатков серина или треонина в исходной последовательности (для О-связанных сайтов гликозилирования). Для простоты белковую последовательность аминокислот предпочтительно изменяют на уровне ДНК, в частности путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид в предварительно выбранных основаниях таким образом, что образованные кодоны преобразуются в необходимые аминокислоты.

Соответственно N-связанные сайты гликозилирования могут быть добавлены путем изменения кодона одной аминокислоты. Например, кодоны, кодирующие N-X-z (где z представляет собой любую аминокислоту), могут быть изменены, чтобы кодировать N-X-T (или N-X-S), или кодоны, кодирующие y-X-T/S, могут быть изменены для кодирования N-X-T/S. Кроме того, кодоны, кодирующие две аминокислоты, могут быть одновременно изменены для введения N-связанного сайта гликозилирования (например, кодоны для y-X-z могут быть изменены для кодирования N-X-T/S). Таким образом, могут быть вставлены от одного до десяти N-связанных сайтов гликозилирования.

В дополнение к вставке N-связанных сайтов гликозилирования в TIMP-3 любые сайты гликозилирования, которые присутствуют в нативном TIMP-3, могут быть модифицированы, например, с целью стабилизации структуры молекулы. Так, например, А в остатке 208 может быть замещен другим остатком, таким как Y, V или G. Дополнительные модификации сайта 'N-X-T' остатками 206-208 включают замещение F на I в остатке 205 или Y на I в остатке 205 в сочетании с одним из указанных выше замещений в остатке 208.

В другом варианте осуществления изобретения участки, чувствительные или восприимчивые к протеолитическому расщеплению, определяли и подвергали мутации. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены мутации TIMP-3 или варианты, которые проявляют сниженное взаимодействие с фагоцитарным рецептором LRP-1. В одном варианте осуществления такие мутации получены путем выявления и мутации остатков лизина, которые, как предполагается, играют важную роль во взаимодействии TIMP-3 и LRP-1.

Кроме того, следует отметить, что мутеин TIMP-3 или вариант может проявлять более одного из этих свойств (например, вставленный сайт гликозилирования может снизить необходимость внесения гепарина в клеточную культуральную среду, снизить взаимодействие с LRP-1 и повысить устойчивость к протеолизу). Дополнительные варианты осуществления изобретения включают мутации TIMP-3 или варианты, имеющие более одной мутации, например, в том случае, если сочетание мутаций приводит к более чем одному из вышеуказанных свойств или воздействий.

Необходимые мутации TIMP-3 могут быть определены несколькими способами. В первом способе в анализе силикомарганца используется для упрощения ребалансирования заряда между TIMP-3 и соответствующим ингибитором металлопротеиназы, TIMP-2 (обнаружено, что последний обладает хорошим профилем экспрессии млекопитающих). В одном варианте осуществления настоящего изобретения поверхностно положительно заряженные участки TIMP-3 перераспределены к мимической заряженной поверхности TIMP-2. В другом варианте осуществления изобретения разница заряда между TIMP-2 и TIMP-3 скрывается за счет введения сайтов гликозилирования. Введение гликозилирования может применяться для улучшения экспрессии (см., например, Enhancing the Secretion of Recombinant Proteins by Engineering N-Glycosylation Sites. Liu Y. et al, Amer Inst Chem Eng 2009, p. 1468).

Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения подгруппу гидрофильных сайтов, разработанных с помощью вычислительного анализа, проверяются на схожесть N-гликозилирования. Для способов, включающих введение сайтов N-гликозилирования, применяется инструмент для определения сайтов гликозилирования, и инструмент прогнозирования N-гликозилирования является полезным в выборе локализации мутации для проведения N-связанного гликозилирования, например, за счет определения остатков, мутировавших для формирования канонических сайтов N-x-T-гликозилирования (в которых N представляет собой аспарагин, x представляет собой аминокислоту и T представляет собой треонин). В дополнительных вариантах осуществления изобретения способы анализа структуры применяются для определения всех гидрофильных аминокислот (включая аминокислоты, экспозиция боковой цепи которых $>20\text{\AA}^2$). Дополнительные варианты осуществления изобретения включают мутацию LRP1-опосредованных лизинов в TIMP-3, основанную на кристаллической структуре LRP1/RAP (рецептор-ассоциированный белок) при взаимодействии лизинов RAP с TIMP-3.

В данном документе рассмотрены дополнительные комбинации. Например, мутация F57N может быть получена в сочетании с мутацией в остатке лизина, причем остаток лизина представляет собой любой лизин в TIMP-3. В одном варианте осуществления изобретения один лизин мутантный; в другом варианте осуществления изобретения два, три, четыре или пять остатков лизина являются мутантными. В некоторых вариантах осуществления изобретения остатки лизина в аминокислоте 45 и/или 133 могут

быть мутантными. В другом примере в результате мутации F57N вводится единичный N-связанный сайт гликозилирования; эта мутация может быть получена с помощью дополнительных мутаций для введения дополнительных сайтов гликозилирования или с помощью других мутаций, предназначенных для влияния на одно или более из вышеупомянутых свойств TIMP-3. Настоящее изобретение предусматривает мутеины TIMP-3 или варианты, содержащие один введенный N-связанный сайт гликозилирования, содержащие два, три или четыре N-связанных сайта гликозилирования и содержащие пять или более N-связанных сайтов гликозилирования.

Конкретные мутации проиллюстрированы на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 проиллюстрировано выравнивание нативного полноразмерного человеческого TIMP-3 и мутированной формы полноразмерного человеческого TIMP-3, в которой буква "X" была замещена конкретными аминокислотами в последовательности. Сигнальная последовательность подчеркнута; другие сигнальные последовательности могут быть замещены таким образом, как описано в данном документе. Определенные замещения предусмотрены в зрелой форме TIMP-3 и обозначены здесь как "n # m", где "n" обозначает аминокислоту, что содержится в нативном полноразмерном TIMP-3, "#" обозначает номер аминокислотного остатка, а "m" обозначает аминокислоту, которая была замещена. Так, например, "K45N" означает, что лизин (K) у аминокислоты 45 был замен на аспарагин (N). Мутированные формы человеческого TIMP-3, описанные в данном документе в качестве примеров, содержат следующие мутации (отдельно или в комбинации): K45N; K45S; V47T; K50N; V52T; P56N; F57N; G58T; T63E; T63N; K65T; T74E; H78E; H78E; H78N; Q80T; K94N; E96T; D110N; K112T; Q126N; R138T и G173T. Комбинации этих мутаций также рассматриваются и могут включать от двух до десяти (т.е. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) из вышеуказанных замещений.

Специфические комбинации мутаций включают

K45E, K49S;

K45E, K49E; K45E, T63E; K45E, Q80E; K45E, T63E, H78E; T63E, H78E, Q80E; K45E, T63E, H78E, Q80E; L51T, T74E, H78D; T74E, H78E, Q80E; T74E, H78D, Q80E; K45N, V47T; K49N, L51T; K75N, P77T; K45E, K49N, L51T, T63E; E96N, N98T; V97N, K99T; R138N, H140T; T158N, K160T; T166N, M168T; H181N, A183T; R186N, K188T; P201N, K203T; A208Y; A208V; T63E, T74E, H78E; T63E, T74E, H78D; K65N, M67T; K45N, V47T, T63E, T74E, H78E; K49N, L51T, T63E, T74E, H78E; K49N, L51T, T74E, H78E; K49N, L51T; K50N, V52T; L51N, K53T; T63N, K65T; H78N, Q80T; K94N, E96T; D110N, K112T; Q126N; R138T; G173T; F57N; P56N, G58T; P56N, G58T; T63N, K65T; K45S, F57N; K49S, F57N; K68S, F57N; K133S, F57N; K45S, K133S, F57N; и K49S, K68S, F57N.

Дополнительные комбинации включают

K45S, F57N, D110N,

K112T; K45S, F57N, H78N, Q80T, D110N, K112T; K45S, F57N, H78N, Q80T, D110N, K112T, Q126N; K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T Q126N; K45S, F57N, H78N, Q80T, Q126N, G173T; K45S, F57N, T63N, K65T; K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T; K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, G173T; K45S, F57N, T63N, K65T, R138T, G173T; K45N, V47T, F57N, T63N, K65T, R138T, G173T; K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T; K45N, V47T, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T; K45S, F57N, Q126N, R138T, G173T; P56N, G58T, T63N, K65T, K94N, E96T, Q126N, G173T; P56N, G58T, T63N, K65T, D110N, K112T, Q126N, G173T; и K45S, F57N, Q126N, R138T, G173T.

Дополнительные мутации включают

K49S, K50N/V52T, K53E,

V97N/K99T, R186N/K188T; K50N/V52T, V97N/K99T, R186N/K188T; K49E, K53E, K188Q; K50N/V52T, R186N/K188T; K50N/V52T, F57N, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N, R186N/K188T; K50N/V52T, F57N, T63N/K65T, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N R186N/K188T; K45S, K49S, K50N/V52T, F57N R186N/K188T; K49S, K50N/V52T, F57N, V97N/K99T, R186N/K188T; и K45S, K50N/V52T, F57N, V97N/K99T, R186N/K188T.

На фиг. 2 проиллюстрировано выравнивание нативного полноразмерного человеческого TIMP-3 и вариант TIMP-3, в котором было произведено замещение определенных аминокислот с целью получения последовательности, более сходной с последовательностью TIMP-2. Сигнальная последовательность нативной полноразмерной последовательности TIMP-3 представлена и подчеркнута для обеспечения со-

гласованности нумерации; другие сигнальные последовательности могут быть замещены таким образом, как описано в данном документе. В последовательности варианта TIMP-3 "X" был замещен на конкретные аминокислоты для обозначения остатков в зрелой форме TIMP-3, в котором предусмотрены замещения; данные замещения включают H, K, P, R, S или W в остатке 25; A в остатке 27; D, L или S в остатке 28; N в остатке 32; T в остатке 39; T, F, A или N в остатке 43; I или T в остатке 45; D в остатке 46; S в остатке 48; S в остатке 49; T в остатке 51; N в остатке 63; N в остатке 67; I в остатке 68; D или W в остатке 78; T в остатке 96; N в остатке 202 и S в остатке 207. Замещения могут быть проведены индивидуально или в комбинации. Таким образом, используя форматирование, описанное на фиг. 1, один вариант, приведен в качестве примера на фиг. 2, представляет собой A27T, I68K. Также предполагаются дополнительные комбинации, которые могут включать от двух до десяти вышеуказанных замен. Кроме того, замещения, описанные на фиг. 2, могут быть объединены с замещениями, описанными на фиг. 1, например A27T, P56N, G58T.

В Lee et al. (J. Biol. Chem. 282:6887; 2007) раскрыто исследование, предусматривающее определение мотивов связывания внеклеточного матрикса TIMP-3. Когда они не смогли определить известные последовательности связывания гепарина в TIMP-3, они определили одиннадцать остатков лизина и аргинина, расположение которых дало возможность предположить, что боковые цепи этих основных аминокислот будут сосредоточены на поверхности TIMP-3 в значительной высокой плотности. Данные остатки представляли собой K26, K27, K30, K71, K76, R100, K123, K125, K137, R163, K165 (используя систему нумерации, используемую в данном документе, нумерация данных остатков K49, K50, K53, K94, K99, R123, K146, K148, K160, R186, K188). Таким образом, дополнительные мутеины TIMP-3, приведенные ниже. Предполагается, что эти мутеины обладают частичной или полной гепариновой независимостью. В дополнение к модификации поверхностно-направленных основных аминокислотных боковых цепей, некоторые из данных мутаций вводят N-связанный сайт гликозилирования в мутеин TIMP-3 (например, K94N/E96T).

Мутеины, полученные для снижения гепариновой зависимости, представляют собой K49E, K50E, K53E, K99E, R186Q, K188Q; K49E, K50E, K53E, F57N, K99E, R186Q, K188Q; K45S, K50E, K53E, F57N, K99E, R186Q, K188Q; K49S, K50N/V52T, K99E, K188Q; K50N/V52T, K99E, K188Q; K50N/V52T, K94N/E96T, K188Q; K50N/V52T, K94N/E96T, G173T; K50N/V52T, R186N/K188T; K50N/V52T, K94N/E96T, R186N/K188T; K50N/V52T, F57N, K94N/E96T, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N, K94N/E96T, R186N/K188T; K50N/V52T, T63N/K65T, K94N/E96T, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, T63N/K65T, K94N/E96T, R186N/K188T. В соответствии с настоящим изобретением, некоторые из таких мутеинов могут проявлять различные необходимые свойства. Например, некоторые из мутеинов содержат вставленные N-связанные сайты гликозилирования; другие мутеины содержат мутации, которые повышают экспрессию в системе клеток млекопитающих.

Варианты TIMP-3, мутеины или производные будут иметь аминокислотную последовательность, которая подобна нативной последовательности TIMP-3. В одном варианте осуществления изобретения вариант, мутеин или производное TIMP-3 будут по меньшей мере на 85% идентичны нативному TIMP-3; в другом варианте осуществления изобретения вариант, мутеин или производное TIMP-3 будут по меньшей мере на 90% идентичны нативному TIMP-3; в другом варианте осуществления изобретения вариант, мутеин или производное TIMP-3 будут по меньшей мере на 95% идентичны нативному TIMP-3. В других вариантах осуществления изобретения вариант, мутеин или производное TIMP-3 по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичны нативному TIMP-3. Процент идентичности, используемый в данном документе, относится к сравнению зрелого полноразмерного варианта, мутеина или производного со зрелым полноразмерным нативным TIMP-3, т.е. с TIMP-3, в котором отсутствует сигнальный пептид (аминокислоты TIMP-3 от 24 до 211). Специалистам в данной области техники понятно, что подобное сравнение может быть проведено между вариантом, мутеином или производным N-концевого домена TIMP-3 и N-концевого домена нативного TIMP-3.

Сходство также может быть выражено количеством аминокислот, которое отличается в мутеине или варианте и в нативном TIMP-3. Например, вариант TIMP-3 или мутеин может отличаться от нативного TIMP-3 на одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот. Вариант или мутеин, который отличается от нативного TIMP-3 на десять аминокислот, будет на около 95% идентичен нативному TIMP-3. В других вариантах осуществления изобретения вариант TIMP-3 или мутеин отличается от нативного зрелого TIMP-3 на 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Дополнительные изменения могут быть получены в нуклеиновой кислоте, кодирующей TIMP-3 полипептид (как нативный, мутеин, вариант, так и производное), для усиления экспрессии. Например, сигнальный пептид нативного TIMP-3 может быть замещен другим сигнальным пептидом.

Другие производные полипептидов TIMP-3 в пределах объема настоящего изобретения включают ковалентные или агрегированные конъюгаты полипептидов TIMP-3 или их фрагментов с другими белками или полипептидами, например, путем экспрессии рекомбинантных гибридных белков, содержащих гетерологичные полипептиды, сшитые с N-концом или C-концом полипептидов TIMP-3. Например, конъюгированный пептид может представлять собой гетерологичный сигнальный (или лидерный) пептид, например лидерная последовательность альфа-фактора дрожжей, или пептид, такой как эпитопная

метка. Специалистам в данной области техники понятно, что гетерологичный сигнальный пептид может отличаться по длине от сигнального пептида нативного TIMP-3, но может правильно определить положение мутеинов по отношению к аминокислотной последовательности зрелого TIMP-3 за счет выравнивания N-концевых остатков цистеина полипептидов TIMP-3, полученных с использованием гетерологичных сигнальных пептидов.

Полипептид TIMP-3, содержащий гибридные белки, может содержать пептиды, введенные для упрощения очистки или определения полипептида TIMP-3 (например, поли-His). Другой маркерный пептид представляет собой пептид FLAG®, описан в Horp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988 и патенте США 5011912. Пептид FLAG® является высокоантигенным и способствует обратимому связыванию эпитопа со специфическим моноклональным антителом (mAb), способствуя быстрому анализу и упрощенной очистке экспрессированного рекомбинантного белка. Реагенты, применяемые для получения гибридных белков, в которых пептид FLAG® слит с данным полипептидом, являются коммерчески доступными (Sigma, St. Louis, MO).

Ковалентные модификации также рассматриваются как производные полипептидов TIMP-3 и включены в объем настоящего изобретения, и, как правило, но не всегда, получают посттрансляционно. Например, в несколько типов ковалентных модификаций связывания антигена белок вводят в молекулу в результате взаимодействия конкретных аминокислотных остатков антигенсвязывающего белка с органическим дериватизирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

Как правило, остатки цистеинила вступают в реакцию с альфа-галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, что сопровождается образованием производных карбоксиметила или карбоксиамидометила. Остатки цистеинила также модифицируются путем реакции с бромтрифторацетоном, альфа-бром-бета-(5-имидозил)пропионовой кислотой, фосфатом хлорацетила, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутным бензоатом, 2-хлорртутным-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения цистеиниловый остаток вводят в нативную последовательность TIMP-3, например, путем изменения выбранного(ных) кодона(ов) для кодирования Cys. Показано, что такое Cys замещение может быть получено в участках TIMP-3, которые являются важными для экспрессии, фолдинга или других свойств, описанных в настоящем документе.

Количество углеводных остатков белков по настоящему изобретению может быть увеличено путем ферментативного или химического связывания гликозидов с белком. Данные методики являются преимущественными в связи с тем, что они не предусматривают синтеза белка в клетке-хозяине, обладающей способностью гликозилирования относительно N- и O-гликозилирования. В зависимости от способа связывания, сахар (сахара) может быть прикреплен к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, в частности цистеину, (d) свободным гидроксильным группам, в частности серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, в частности фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Данные способы описаны в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, p. 259-306.

Удаление углеводных остатков, присутствующих в исходном рекомбинантном белке, может быть осуществлено химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование предусматривает воздействие на белок состава трифторметансульфокислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептиды нетронутыми.

Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное расщепление углеводных остатков полипептидов может быть достигнуто за счет использования различных эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350.

Гликозилирование потенциальных сайтов гликозилирования может быть предотвращено путем использования состава туникамицина, как описано Duskin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Туникамицин блокирует формирование связей белок-N-гликозид.

Другой тип ковалентной модификации антигенсвязывающего белка включает связывание белка с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь этим, различные полиолы, в частности полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, в порядке, установленном в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, аминокислотные замены могут быть проведены в различных локусах белка для упрощения введения полимеров, в частности ПЭГ.

Экспрессия полипептидов TIMP-3.

Согласно данному изобретению любая система экспрессии, известная в данной области техники, может быть использована для получения рекомбинантного полипептида. В общем, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным вектором экспрессии, который содержит ДНК, кодирующую необхо-

димый полипептид TIMP-3 (в том числе мутеины TIMP-3 или варианты). Клетки-хозяева, которые могут быть использованы, представляют собой прокариоты, дрожжи или клетки высших эукариотов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. Высшие эукариотические клетки включают клетки насекомых и определенные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток COS-7 из почек обезьян (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки 293, клетки C127, 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, линии клеток BHK (ATCC CRL 10) и линию клеток CVI/EBNA, полученную из линии клеток почки CVI (ATCC CCL 70) африканской зеленой обезьяны, как описано McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821. Надлежащее клонирование и экспрессия векторов для использования в бактериальных, грибковых, дрожжевых и клетках-хозяевах млекопитающих описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985).

Экспрессия в клетках млекопитающих может обеспечить преимущества для получения полипептидов TIMP-3, способствуя фолдингу и принятию конформации, существенно напоминающей конформацию нативного TIMP-3. В данной области техники известны и/или являются коммерчески доступными многочисленные системы для экспрессии в клетках млекопитающих; последние включает такие системы, как Gibco®Freedom® CHO-S® (продукт, предназначенный для простоты использования со всеми аспектами клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в суспензионной культуре, полученной из яичника китайского хомячка (CHO), ProBioGen, Life Technologies; Carlsbad, CA), GS Gene Expression System™ (система трансфекции, разработанная для обеспечения получения высокопродуктивных, стабильных, цГМФ-совместимых клеточных линий млекопитающих, Lonza Biologies, Slough, UK), технология PER.C6® (пакет инструментов предназначен для обеспечения крупномасштабного производства рекомбинантных белков с использованием ряда непрерывного деления клеток, полученных из единичной immortalized человеческой клетки; Crucell, Leiden, The Netherlands) или immortalized клеток амниоцитов, таких как CAP и CAP-T (системы экспрессии на основе клеток человека для экспрессии и получения сложных белков; Cevac, Cologne, Germany).

Дополнительные системы для экспрессии в клетках включают системы, такие как SUREtechnology Platform™ (технологическая платформа, которая может быть применена для множества клеточных линий с целью обеспечения разработки клеточных линий для получения рекомбинантных белков; Selexis Inc., Switzerland); системы трансфекции млекопитающих ProFection® (система трансфекции, что обеспечивает высокоэффективную трансфекцию клеток для производства рекомбинантных белков; Promega, Madison WI); система экспрессии Expi293™ (система экспрессии транзитного белка млекопитающих высокой плотности, Life Technologies, GrandIsland, NY) и MaxCyte® VLX™, а также STX™ транзиентные системы трансфекции (масштабируемая система трансфекции для использования в производстве рекомбинантных белков, в том числе антител; MaxCyte, Gaithersburg, MD. Специалистам в данной области техники дополнительно известно о других системах экспрессии, таких как методы, что первоначально описываются Wigler et al. (Cell 1979:777) и дополнительных методах, описанных, например, на веб-сайте Национального научно-исследовательского совета Канады.

Различные емкости, известные в данной области техники, являются пригодными для культивирования трансформированных клеток и получения рекомбинантных белков. Они включают 24-луночные планшеты, качалочные колбы (250 мл и 1 л) и различные биореакторы различных размеров, например 2, 5, 10, 30, 100, 1000, 10000 л и большие биореакторы. Другие подходящие емкости для культивирования клеток, которые известны в данной области техники и могут быть также использованы, как описано в данном документе.

Составы сред для клеточных культур хорошо известны в данной области техники; как правило, культуральная среда содержит заменимые и незаменимые аминокислоты, витамины, источники энергии, липиды и микроэлементы, необходимые для клетки для минимального роста и/или выживания, а также буферы и соли. Культуральная среда может также содержать дополнительные компоненты, которые повышают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, в том числе, но не ограничиваясь ими, гормоны и/или другие факторы роста, конкретные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеотиды или нуклеозиды, микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), аминокислоты, липиды и/или глюкоза, или другой источник энергии; как описано в данном документе, ингибиторы клеточного цикла могут быть добавлены в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения среду предпочтительно доводят до уровня pH и концентрации соли, оптимальной для выживания и пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения среда представляет собой питательную среду, которая вносится после начала культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения среда для культивирования клеток представляет собой смесь исходного питательного раствора и любой питательной среды, которые вносят после начала культивирования клеток.

Различные среды для культивирования тканей, в том числе определенные среды для культивирования, являются коммерчески доступными, например может быть использована любая из следующих сред

для культивирования клеток или их комбинация: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальная питательная среда Игла, среда F-12K, среда Хама F12, среда Искова в модификации Дульбекко, среда Маккоя 5A, среда Лейбовица L-15 и бессывороточная среда, в частности серии EX-CELL™ 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), среди прочих. Бессывороточные варианты данных культуральных среды также доступны. Среда для культивирования клеток могут дополнительно содержать дополнительные или повышенные концентрации компонентов, таких как аминокислот, солей, сахаров, витаминов, гормонов, факторов роста, буферов, антибиотиков, липидов, микроэлементов и т.п., в зависимости от условий культивирования клеток и/или необходимых параметров культивирования клеток.

Трансформированные клетки могут культивировать в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, и полипептид выделяют обычными методами очистки белков. Одна из таких процедур очистки включает использование аффинной хроматографии, а также других методов, известных в данной области техники. Один из способов выделения родительского TIMP-3 или мутеина TIMP-3 из супернатантов млекопитающих представляет собой использование TIMP-3, который слитый с карбоксильным концом 6х-гистидинового маркера в сочетании 6х-гистидин аффинной Ni-сефарозной смолой (например, металлхелатная аффинная хроматография (IMAC); общие процедуры известны в данной области техники, и реагенты примеры для таких процедур обозначены QIAGEN, Germantown, MD и GE Healthcare, Pittsburg, PA). Катионообменная хроматография (например, SP-HP Sepharose®, GE Healthcare) может быть использована для дальнейшего выделения TIMP-3 после элюирования IMAC или в качестве альтернативного приема без использования IMAC для захвата TIMP-3 из супернатантов млекопитающих (элюирование TIMP-3 и их мутеинов происходит с использованием градиента хлорида натрия при нейтральном значении pH). Гель-хроматография (например, Superdex 200®, GE Healthcare, (пример подвижной фазы: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)) представляет собой общую стратегию, которая может быть использована для дальнейшего выделения TIMP-3 или их мутеинов (в сочетании с процессом IMAC или ионообменной хроматографией). Эти и другие способы хорошо известны в данной области техники, см., например, Protein Purification: Principles: High Resolution Methods, and Applications, Third Edition (2012, John Wiley and Sons; Hoboken, NJ).

Количество полипептида (нативного TIMP-3 или мутеина TIMP-3, или варианта) может быть определено с помощью любого подходящего количественного или полуколичественного способа, с помощью которого можно провести анализ количества рекомбинантного TIMP-3 (нативного, варианта или мутеина) в клеточной культуральной надосадочной жидкости, т.е. кондиционированной среде (СМ). Подходящие качественные или полуколичественные способы включают вестерн-блоттинг и окрашивание Кумаси гелей SDS-PAGE. Количественные измерения могут включать использование иммуноферментного анализа, такого как измерение человеческого TIMP-3 с помощью ELISA (R & D Systems Inc., Миннеаполис, Миннесота) или ForteBio Octet® (Pall ForteBio Corp, Menlo Park, CA) с антитело-опосредованным захватом TIMP-3 или прямым измерением УФ (ультрафиолет) поглощения (280 нм) очищенного TIMP-3.

Таким образом, действие конкретной мутации в TIMP-3 может быть определено путем сравнения полученного количества рекомбинантного мутеина с количеством нативного белка, полученного при сходных условиях культивирования. Экспрессия мутеина TIMP-3 или варианта может наблюдаться на уровнях, которые на 1х, 2х, 3х, 4х, 5х, 10х или выше по сравнению с нативным TIMP-3. При необходимости, удельная продуктивность конкретной трансформации или трансфекции клеточной линии может быть определена для проведения сравнения удельной производительности для различных форм TIMP-3. Удельная производительность, или qP, выражается в пикограммах рекомбинантного белка на клетку в день (пг/кл/д) и может быть легко определена с применением методов, известных в данной области техники, подсчета клеток в культуре и вышеупомянутых способах количественного определения рекомбинантного белка.

Применение полипептидов TIMP-3.

Полипептиды TIMP-3, варианты, мутеины или их производные могут быть использованы, например, в анализах или для лечения любого состояния, в котором более высокий уровень активности TIMP-3 является желательным (т.е. условия, в которых матричные металлопротеазы (ММП) и/или другие протеиназы, которые ингибируются или являются ингибируемыми TIMP-3, играют причинную и усугубляющую роль), включая, но не ограничиваясь воспалительными заболеваниями, остеоартритом и другими состояниями, для которых характерна чрезмерная или ненадлежащая активность ММП (например, ишемия миокарда, реперфузионное повреждение и в процессе развития застойной сердечной недостаточности). Воспалительные состояния включают астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЗ) и идиопатический фиброз легких (IPF), воспалительное заболевание кишечника (например, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона и целиакия), псориаз, миокардит, включая вирусный миокардит, воспаление, связанное с атеросклерозом, и артритные состояния, включая ревматоидный артрит и псориатический артрит и т.д.

Полипептид TIMP-3, вариант мутеина или производные композиций, описанные в данном документе, изменяют патогенез и способствуют благотворному лечению заболеваний или состояний, характери-

Исходя из способности TIMP-3 ингибировать разрушение соединительной ткани, полипептиды

TIMP-3, варианты, мутеины или их производные могут применяться в тех случаях, когда ингибирование ангиогенеза является необходимым, например, для предотвращения или замедления развития опухоли и предотвращения инвазии паразитов. Например, в области появления опухолей и метастазирования метастатический потенциал некоторых конкретных опухолей коррелирует с повышенной способностью синтезировать и секретировать коллагеназы и с невозможностью синтезировать и выделять значительное количество ингибитора металлопротеиназы. Белки TIMP-3, раскрытые в настоящем документе, также имеют терапевтическое применение для ингибирования распространения опухолевых клеток во время удаления первичной опухоли, при химиотерапии и лучевой терапии, при удалении инфицированных участков костного мозга и во время шунтирования карциноматозного асцита. В диагностических целях корреляция между отсутствием выделения TIMP-3 в образце опухоли и ее метастатическим потенциалом является полезной в качестве прогностического индикатора, а также в качестве индикатора возможного предотвращения терапии.

MMP также действуют на базальную мембрану и плотно соединенные белки в головном мозге как часть пути для открытия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что облегчает вход клеток и растворимых медиаторов воспаления в мозг. Соответственно настоящие композиции и способы могут быть использованы при лечении расстройств нервной системы, характеризующиеся чрезмерной или несоответствующей проницаемостью ГЭБ. Кроме того, разрушение белков матрикса вокруг нейронов может привести к потере контакта и гибели клеток; таким образом, раскрытые композиции TIMP-3 могут защищать нервные клетки от повреждений, сохраняя базальную мембрану, окружающую нервные клетки. Предлагаемые в изобретении TIMP-3 композиции могут применяться для лечения или ослабления нейровоспалительного ответа на травму, например церебральной ишемии или черепно-мозговой травмы. Композиции, раскрытые в данном документе, также могут применяться для лечения нейродегенеративных заболеваний, для которых воспаление является основной причиной заболевания, например рассеянного склероза, а также в лечении различных форм невропатии и/или миопатии, травмы спинного мозга и бокового амиотрофического склероза (БАС). Соответственно применение композиций согласно изобретению может включать совместное введение с BDNF, NT-3, NGF, CNTF, NDF, SCF или других факторов роста нервных клеток или модуляции пролиферации. Кроме того, настоящие композиции и способы могут применяться в косметических целях при условии, что локализованное ингибирование разрушения соединительной ткани может изменить внешний вид ткани.

Полипептиды TIMP-3, варианты, мутеины или их производные могут быть использованы в процедуре *in vitro* или вводиться *in vivo* для повышения эндогенной активности TIMP-3 и/или повышения TIMP-3-индуцированной биологической активности. Предлагаемые в изобретении TIMP-3 полипептиды, варианты, мутеины или производные могут быть использованы *in vivo* при условии снижения количества или поддержания на низком уровне эндогенных TIMP-3. Таким образом, расстройства, вызванные или обостренные (прямо или косвенно) TIMP-3-ингибируемыми протеиназами, примеры которых приведены в данном документе, могут поддаваться лечению. В одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет собой способ лечения, включающий введение TIMP-3 полипептида, варианта, мутеина или производного млекопитающему *in vivo* при необходимости, в количестве, эффективном для увеличения TIMP-3-индуцированной биологической активности. В другом варианте осуществления настоящее изобретение представляет собой способ лечения, включающий введение *in vivo* TIMP-3 полипептида, варианта, мутеина или производного млекопитающему при необходимости, в количестве, эффективном для повышения эндогенных уровней TIMP-3.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет полипептиды TIMP-3, варианты, мутеины или их производные, имеющие улучшенный полураспад *in vivo*. В одном варианте осуществления изобретения период полураспада мутеина TIMP-3 по меньшей мере в два раза больше по сравнению с нативным TIMP-3; в другом варианте осуществления изобретения период полураспада по меньшей мере в три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, восемь раз или в десять раз больше по сравнению с нативным TIMP-3. В одном варианте осуществления изобретения период полураспада определяется в млекопитающих, исключаящих человека; в другом варианте осуществления изобретения период полураспада определяется у человека. Дополнительные варианты осуществления изобретения представляют собой мутеин TIMP-3 или вариант, который имеет период полураспада по меньшей мере один день *in vivo* (например, при введении субъекту-человеку). В одном варианте осуществления изобретения TIMP-3 полипептиды, варианты, мутеины или их производные имеют период полураспада менее трех дней. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды TIMP-3, варианты, мутеины или их производные имеют период полураспада четыре дня или дольше. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды TIMP-3, варианты, мутеины или их производные имеют период полураспада восемь дней или дольше.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид TIMP-3, варианты или мутеины дериватизируют или модифицируют таким образом, что он имеет более длительный период полувыведения по сравнению с недериватизированным или немодифицированным TIMP-3-связывающим белком.

Дериватизированный полипептид может содержать любую молекулу или вещество, которое придает необходимые свойства полипептиду, такие как увеличение периода полураспада для конкретного

применения. Дериватизированный полипептид может содержать, например, выявляемый (или маркирующий) фрагмент (например, радиоактивную, колориметрическую, антигенную или ферментативную молекулу, выявляемую гранулу (например, магнитную или электроплотную (например, золотую) гранулу) или молекулу, которая связывается с другой молекулой (например, биотин или стрептавидин)), терапевтический или диагностический компонент (например, радиоактивный, цитотоксический или фармацевтически активный компонент или молекулу, повышающую пригодность полипептида для конкретного применения (например, введения субъекту, такому как субъект-человек или другое применение *in vivo* или *in vitro*)).

В одном таком примере полипептид получен с использованием лиганда, который специфически связывается с тканями суставного хряща, например, как раскрыто в WO2008063291 и/или Rothenfluh et al., *Nature Materials* 7:248 (2008). Примеры молекул, которые могут применяться для дериватизации полипептида, включают альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин) и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Альбумин-связанные и ПЭГилированные производные полипептидов могут быть получены с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. В одном варианте осуществления изобретения полипептид конъюгирован или иным способом связан с транстиретином (TTR) или вариантом TTR. TTR или вариант TTR может быть химически модифицирован, например, химическим веществом, выбранным из группы, состоящей из декстрана, поли-(N-винилпирролидона), полиэтиленгликолей, гомополимеров пропиленгликоля, сополимеров оксида полипропилена/оксида этилена, полиоксипропилированных полиолов и поливиниловых спиртов (заявка на патент США № 20030195154).

Композиции.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество полипептидных продуктов (т.е. полипептидов TIMP-3, вариантов, мутантов или их производных) по изобретению вместе с фармацевтически приемлемыми растворителями, консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями, применяемыми для терапии TIMP-3 (т.е. состояние, при которых применяются повышенные эндогенные уровни TIMP-3 или увеличение активности эндогенного TIMP-3). Такие композиции включают растворители с различным содержанием буфера (например, Трис-HCl, ацетат, фосфат), pH и ионной силы; добавки, такие как детергенты и солюбилизирующие агенты (например, Твин 80, Полисорбат 80), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия), консерванты (например, тиомерсал, бензиловый спирт) и наполнители (например, лактоза, маннит); ковалентное присоединение полимеров, таких как полиэтиленгликоль к белку (как обсуждалось выше, см., например, патент США 4179337, включено в данное описание в качестве ссылки); включение материала в конкретные препараты полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д., или в липосомы. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса TIMP-3-связывающих белков *in vivo*; см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) с. 1435-1712, которые включены в данное описание путем ссылки.

Как правило, эффективное количество данных полипептидов определяется в зависимости от возраста, веса и состояния или тяжести заболевания реципиента; см., Remington's Pharmaceutical Sciences, выше, на с. 697-773, который включен в данный документ путем ссылки. Как правило, согласно определению опытного практикующего клинициста дозирование может составлять от около 0,001 до около 1 г/кг массы тела, но более или менее. Для локального (т.е. не системного) применения, такого как наружного или внутрисуставного применения, дозировка может быть в пределах от около 0,001 до около 1 г/см². Дозирование может быть один или более раз в день, или реже, и может быть в сочетании с другими композициями, как описано в данном документе. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивает дозирования, указанного в данном документе.

Как понятно в данной области техники, фармацевтические композиции, содержащие молекулы по изобретению, вводят субъекту в форме, соответствующей указаниям. Фармацевтические композиции могут вводить любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь, парентеральное, наружное, локальное введение, или путем ингаляции. При условии парентерального введения фармацевтическая композиция может быть введена, например, с помощью внутривенного, внутримышечного, внутривентриального, внутримышечного введения или подкожно, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии.

Локальное нанесение, например, на участок поражения или травмы предусматривает трансдермальную доставку и замедленное высвобождение из имплантатов. Другие варианты включают глазные капли; оральные препараты, включая таблетки, сиропы, пастилки или жевательную резинку; и препараты для местного применения, такие как лосьоны, гели, спреи, и мази. Например, локальное введение в суставы или опорно-двигательный аппарат включает периартикулярное, внутрисуставное, интрасиновиальное, внутривисцеральное, внутрисуставное и внутрисухожильное введение. Введение в дыхательную систему включает интратрахеальное, интратрахеальное, интратрахеальное, интратрахеальное и интратрахеальное введение, и может быть облегчено, например, с помощью ингалятора или распылителя. Интратрахеальное введение и другие способы, которые могут применяться для введения композиции в мозг и/или нервную систему, также рассматриваются в данном документе, например эпидуральное, ин-

традуральные или перидуральное введения, а также периневральное, интракаудальное, внутримозговое, интракостеральное и спинное введения.

Дальнейшие примеры локального введения включают введение в ткани в сочетании с хирургическим вмешательством или другой медицинской процедурой. Например, фармацевтическая композиция может быть введена в сердечную ткань во время операции, которая выполняется для лечения или ослабления сердечных симптомов или во время процедуры, такой как катетеризация сердца (например, перкутанного коронарного вмешательства). Введение может быть с помощью интракоронарного, интракардиального, интрамиокардиального и/или трансэндокардиального способа, например, и можно руководствоваться эндокардиальными или электромеханическими картами в области сердца, куда будет производиться введение, или при использовании других методов, таких как магнитная резонансная томография (МРТ). Композиции также могут быть доставлены с помощью включения в сердечный пластырь или за счет покрытия стента или других устройств, применяемых для кардиальных состояний.

Кроме глазных капель, для введения настоящих композиций в глаза также рассматривается применение мазей, кремов или гелей. Прямое введение во внутреннюю часть глаза может быть достигнуто путем периокулярного, конъюнктивального, интракорнеального, субконъюнктивального, субтенонового, ретробульбарного, внутриглазного введения и/или инъекции в стекловидное тело. Эти и другие методы обсуждаются, например, в *Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care* (2007, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD).

Множество агентов действует для поддержания динамического равновесия внеклеточного матрикса и тканей. При лечении состояний нарушения равновесия один или более из других агентов могут быть использованы в сочетании с настоящим полипептидом. Эти и другие агенты могут быть введены одновременно или вводиться последовательно, или в комбинации. Как правило, эти другие агенты могут быть выбраны из группы, состоящей из металлопротеиназ, сериновых протеаз, ингибиторов матричных ферментов, разрушающих внутриклеточные ферменты, модуляторов клеточной адгезии, и факторов, регулирующих экспрессию деградации внеклеточного матрикса протеиназ и их ингибиторов. В то время как конкретные примеры приведены ниже, специалистам в данной области техники будет понятно, что другие агенты выполняют эквивалентные функции, в том числе дополнительных агентов или других форм перечисленных агентов (таких как полученных синтетическим путем, с помощью технологии рекомбинантных ДНК, и аналогов, и производных).

Также могут быть использованы другие ингибиторы разрушения при условии необходимости повышенного или более специфического предотвращения разрушения внеклеточной матрицы. Ингибиторы могут быть выбраны из группы, состоящей из альфа2-макроглобулина, белка зоны беременности, овостатина, ингибитора альфа-1-протеиназы, альфа2-антиплазмина, апротинина, протеазы нексина-1, ингибитора плазминогенной активации (PAI)-1, PAI-2, TIMP-1 и TIMP-2. Согласно подтверждению квалифицированных специалистов в данной области техники могут быть использованы и другие ингибиторы.

Внутриклеточные ферменты также могут быть использованы в сочетании с настоящими полипептидами. Внутриклеточные ферменты могут способствовать разрушению внеклеточной матрицы и включают лизосомальные ферменты, гликозидазы и катепсины.

Модуляторы клеточной адгезии также могут быть использованы в комбинации с данными полипептидами. Например, один вариант может предполагать регулирование клеточной адгезии и внеклеточного матрикса до, во время и после ингибирования разрушения внеклеточного матрикса при условии использования настоящих полипептидов. Клетки, которые проявляли адгезию клеток с внеклеточным матриксом, включают остеокласты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, Т-клетки-киллеры и тучные клетки. Модуляторы клеточной адгезии включают пептиды, содержащие мотив "RGD" или аналог, или мимические агонисты, или антагонисты.

Факторы регулирования экспрессии протеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, и их ингибиторов включают цитокины, в частности IL-1 и TNF-альфа, TGF-бета, глюкокортикоиды и ретиноиды. Также могут быть использованы другие факторы роста, влияющие на пролиферацию и/или дифференциацию клеток, если необходимое воздействие состоит в ингибировании разрушения внеклеточного матрикса с использованием данных полипептидов в сочетании с такими клеточными воздействиями. Например, при воспалении необходимым является сохранение внеклеточного матрикса (за счет ингибирования активности ферментов), а также необходимым является синтез нейтрофилов; таким образом, включая введение G-CSF. Другие факторы включают эритропоэтин, представителя семейства интерлейкинов, SCF, M-CSF, IGF-I, IGF-II, EGF, представители семейства FGF, такие как KGF, PDGF и другие. Также предусматривается дополнительная активность интерферонов, в частности альфа-, бета-, гамма-интерферон или консенсус интерферона. Внутриклеточные агенты включают G-белки, протеинкиназу C и фосфатазы инозитола. Применение настоящих полипептидов может обеспечить терапевтическую пользу при наличии одного или более агентов, предусматривающих воспалительную терапию.

Также могут быть использованы агенты миграции клеток. Например, воспаление включает разрушение внеклеточного матрикса и движение или миграцию клеток в область повреждения. Предотвращение разрушения внеклеточного матрикса может предотвратить такую миграцию клеток. Применение данных полипептидов в сочетании с агонистами или антагонистами агентов миграционной модуляции

клеток может быть желательным при лечении воспаления. Агенты миграционной модуляции клеток могут быть выбраны из группы, состоящей из эндотелиальных рецепторов клеточной поверхности (например, E-селектины и интегрины); рецепторов клеточной поверхности лейкоцитов (L-селектины); хемокинов и хемоаттрактантов. Обзор композиций, используемых во время воспалительных процессов, см. Carlos et al., *Immunol. Rev.* 114: 5-28 (1990), который включен в данный документ путем ссылки.

Кроме того, композиции могут включать фактор дифференциации пеп, "NDF" и способы лечения могут включать введение NDF до, одновременно или после введения TIMP-3. Показано, что NDF стимулируют выработку TIMP-2, и комбинация NDF, TIMP-1, -2 и или -3 может обеспечить преимущество в лечении опухолей.

Полипептидные продукты по изобретению могут быть "помечены" по ассоциации с обнаруженным маркерным веществом (например, радиоактивной меткой с I или помечены флуорофором, таким как AlexaFluor® [Lifetechnologies, Grand Island NY]) для разработки реагентов, применяемых для определения количественного измерения TIMP-3 в твердых тканях и жидких образцах, таких как кровь или моча. Например, продукты нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть также помечены маркером для определения (например, радиоактивные и неизотопные метки, такие как биотин) и использованы в процессах гибридизации для выявления соответствующих генов.

Как описано выше, данный полипептид TIMP-3, вариант мутеина или производные композиции могут применяться для широкого спектра расстройств. Таким образом, другой вариант осуществления изобретения, включен в данный документ, представляет собою набор, включая данную композицию и необязательно одну или более дополнительных композиций, описанных выше для лечения расстройства, связанного с разрушением внеклеточного матрикса. Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собою объект технологического процесса, включающий упаковочный материал и фармацевтический агент внутри указанного упаковочного материала, причем фармацевтический агент содержит настоящий полипептид(ы), вариант(ы), мутеин(ы) или производный(ые), где указанный упаковочный материал которого содержит метку, указывающую о терапевтическом применении TIMP-3. В одном варианте осуществления изобретения фармацевтический агент может применяться для определения, выбранного из группы, содержащей рак, воспаление, артрит (в том числе остеоартрит и т.п.), дистрофический буллезный эпидермолиз, заболевание периодонта, язву, эмфизему, поражение костей, склеродермию, заживление ран, эритроцитную недостаточность, косметическое восстановление тканей, оплодотворение или модуляцию эмбрионального имплантата и нарушения нервных клеток. Данный объект технологического процесса может необязательно включать другие композиции и описание меток других композиций.

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения или признаков настоящего изобретения и не ограничивают его объем.

Пример 1.

Данный пример описывает способ, который применяется для определения влияния мутаций или мутаций в TIMP-3, при наличии таковых, приводящих к экспрессии в системах экспрессии млекопитающих. Данный пример описывает общий вектор и систему клетки-хозяина, множественные векторы и системы клетки-хозяина, известные в данной области техники, описанные в данном документе, и подходящие для определения влияния, при наличии таковых, специфических мутаций в последовательности TIMP-3 на экспрессию рекомбинантного белка.

В общем, TIMP-3-кодирующая ДНК лигирована в вектор экспрессии при стандартных условиях (например, для экспрессии TIMP-3-кодирующая ДНК функционально связана с другими последовательностями в векторе) и подходящие клетки млекопитающих трансформируют или трансфицируют с помощью данного вектора. Трансформированные или трансфицированные клетки культивируют при оптимальных условиях, происходит экспрессия рекомбинантного белка и его количество определяют как количественно/полуколичественно, например, с помощью вестерн-блоттинга или SDS=PAGE, так и более качественно, применяя анализ ELSA (R&D Systems, Minneapolis MN) или ForteBio Octet® (Pall ForteBio Corp, Menlo Park, CA). Таким образом, может быть определено влияние мутаций на способность клеток млекопитающих экспрессировать белок TIMP-3, мутеин и варианты.

Если мутацию или мутации проводили с целью введения N-связанных сайтов гликозилирования в полипептид TIMP-3 или для улучшения природного сайта гликозилирования, желательным может быть определение наличия и/или степени гликозилирования. Клетки трансформировали или трансфицировали, как описано выше, и полуколичественные методы измерения (например, вестерн-блоттинг) могут применяться для определения неполного, частичного или полного включения N-связанного гликозилирования.

Пример 2.

Данный пример описывает способ, применяемый для определения повышения гепариновой зависимости за счет мутаций или мутаций в TIMP-3. Клетки трансформируют или трансфицируют, как описано выше, и культивируют при наличии или отсутствии гепарина. Гепарин вносят в разных количествах для разработки полуколичественного понятия степени гепариновой зависимости. Далее определяют количе-

ство белка TIMP-3, мутеина или вариантов, экспрессированных при различных условиях, и проводят сравнение для определения необходимости влияния специфической мутации на высвобождение гепарина из белка TIMP-3, мутеина или варианта из внеклеточного матрикса, а также уменьшается ли количество необходимого гепарина.

Пример 3.

Данный пример описывает анализ ингибирования MMP, в котором активность MMP измеряют с использованием флуориметрических способов; других способов, известных в данной области техники. Например, флуоресцентный сигнал возрастает при расщеплении сигнала резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) 5-FAM/QXL 520 пептидного субстрата подгруппы MMP за счет активированной подгруппы MMP или специфического каталитического домена группы. Пептиды FRET являются доступными из множества MMP, например из Anaspec, Fremont, CA. Белки TIMP-3, применяемые в настоящем исследовании, могут быть как природными TIMP-3, так и мутеином TIMP-3, вариантом или производным; исследуемые белки рассматриваются как тест-молекулы.

Для анализа активности MMP2 человеческую про-MMP2 (Anaspec, Fremont, CA) активируют 1 mM 4-аминофенилртутного ацетата (APMA, Anaspec, Fremont, CA) на протяжении 1 ч при 37°C перед выдерживанием в термостате с MMP2 чувствительным 5-FAM/QXL 520 FRET пептидом в образце буфера при различных концентрациях тест-молекул в черном 384-луночном Optiplate (PerkinElmer, Waltham, MA) при 37°C. После 2 ч инкубирования флуоресцентный сигнал реакционного планшета измеряют при возбуждении (490 нм) и эмиссии (520 нм) с использованием мультимодального микропланшетного ридера EnVision (PerkinElmer, Waltham, MA). Данные относительной единицы флуоресценции (RFU) наносят в зависимости от концентрации исследуемой тест-молекулы на GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) для определения полумаксимальной константы ингибирования (IC50).

Для измерения активности MMP9 каталитический домен человеческой MMP9 (Anaspec, Fremont, CA) инкубировали с пептидом 5-FAM/QXL 520 FRET, чувствительным к MMP9, и различными концентрациями тест-молекул в черном 384-луночном планшете Optiplate (PerkinElmer, Waltham, MA) при 37°C. После 2 ч инкубирования флуоресцентный сигнал измеряли при возбуждении (490 нм) и эмиссии (520 нм) с использованием мультимодального микропланшетного ридера Envision (PerkinElmer, Waltham, MA). Данные относительной единицы флуоресценции (RFU) наносят в зависимости от концентрации исследуемой тест-молекулы на GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) для определения полумаксимальной константы ингибирования (IC50).

Для определения активности MMP13 тест-молекулы титровали в образце буфера (20 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 10 mM ZnCl₂, 0,01% Brij 35 (Calbiochem/EMD, San Diego, CA), pH 7,5) и вносили в черный 96- и 384-луночный полистирольный планшет (Griener Bio-One, Germany). Активированную MMP13 (Calbiochem/EMD) растворяли в образце буфера и вносили для титрования тест-молекулы с последующим инкубированием на протяжении 10 мин при комнатной температуре и конечном объеме 50 мкл. Альтернативно, про-MMP-13 (R & D Systems, Minneapolis, MN) активировали APMA на протяжении 2 ч при 37°C и использовали для анализа. Готовили флуорогенный субстрат, а именно Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂ флуорогенный субстрат MMP или Mca-KPLGL-Dpa-AR-NH₂ флуорогенный пептидный субстрат (R & D Systems) и вносили в раствор фермент MMP-13/huTIMP-3/тест-молекула. Активность MMP-13 измеряли кинетически, например, на протяжении 20 мин с использованием флуоресцентного планшетного ридера (Molecular Devices) (или эквивалента).

Действие исследуемых молекул может быть выражено как процент ожидаемого максимального ингибирования TIMP-3 от ферментативной активности MMP. Кроме того, количественное определение ингибирующей активности MMP может быть не обязательным; предпочтительно определяется способность отдельных тест-молекул ингибировать MMP. Специалисты в данной области техники признают, что параметры, описанные в данном документе, могут быть изменены путем применения стандартных экспериментальных исследований. Например, предварительные эксперименты выполняются с использованием ранее исследуемого TIMP-3 и других материалов для определения соответствующей концентрации MMP или про-MMP. Аналогичным образом также может быть определен тип и соответствующая концентрация субстрата. Так, например, может проводиться титрование MMP и сравнение с ранее исследованной серией MMP для оптимизации параметров анализа. Кроме того, специалисты в данной области техники могут использовать аналогичные анализы для определения действия, при его наличии, различных мутаций TIMP-3 на способность мутеина TIMP-3 или варианта ингибировать другие MMP.

Пример 4.

Нуклеиновые кислоты, которые кодируют множественные мутеины TIMP-3, получали и экспрессировали в клетках млекопитающих, применяя стандартные методы молекулярной биологии, главным образом, как описано выше. Исследовали влияние мутаций на экспрессию мутеинов, кодирующих TIMP-3. Перечень полученных мутаций включает

G115T, N118D; K45E, K49S; K45E, K49E; K45E, T63E; K45E, Q80E; T63E, H78E; K45E, T63E, H78E; T63E, H78E, Q80E; K45E, T63E, H78E, Q80E; T63E, H78D; T63E, T74E, H78E; T63E, T74E, H78D; L51T, T74E, H78D; T74E, H78E, Q80E; T74E, H78D, Q80E; R43T, T74E, H78D, Q80E; R43E, T74E, H78D, Q80E; R43N, K45T; K45N, V47T; K49N, L51T; K65N, M67T; K75N, P77T; R43N, K45T, K49N, L51T;

K45N, V47T, K49N, L51T; R43N, K45T, T63E, T74E, H78E; K45N, V47T, T63E, T74E, H78E; K49N, L51T, T63E, T74E, H78E; K45E, K49N, L51T, T63E; R43T, K49N, L51T, T74E, H78D; R43N, K45T, T74E, H78E; K49N, L51T, T74E, H78E; R43N, K45T, K49N, L51T, T74E, H78E; Q32N, A34T; S38D, D39T; R43N, K45T; V47N, K49T; K49N, L51T; K50N, V52T; L51N, K53T; F57N; P56N, G58T; T63N, K65T; P56N, G58T, T63N, K65T; M67N, M69T; H78N, Q80T; T84N, A86T; K94N, E96T; E96N, N98T; V97N, K99T; K99N, Q101T; T105N, R107T; D110N, K112T; E122N, W124T; R123N, D125T; Q126N; T128N; Q131N, K133T; R132N, G134T; R138N, H140T; R138T; H140N, G142T; K142T; K146N, K148T; T158N, K160T; T166N, M168T; M168N; G173T; HS179N, H181T; H181N, A183T; R186N, K188T; R196N, W198T; P200N, D202T; P201N, K203T; D202N; A208Y; A208V; K45S, F57N; K49S, F57N; K68S, F57N; K133S, F57N; K45S, K133S, F57N; и K49S, K68S, F57N.

Далее проводили исследование экспрессированных мутеинов, описанные ниже. Рассматривали дополнительные мутеины, включая K49E, K50E, K53E, K99E, R186Q, K188Q; K49S, K50N/V52T, K53E, V97N/K99T, R186N/K188T; K50N/V52T, V97N/K99T, R186N/K188T; K49E, K53E, K188Q; K50N/V52T, R186N/K188T; K50N/V52T, F57N, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N, R186N/K188T; K50N/V52T, F57N, T63N/K65T, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N R186N/K188T; K45S, K49S, K50N/V52T, F57N R186N/K188T; K49S, K50N/V52T, F57N, V97N/K99T, R186N/K188T; K45S, K50N/V52T, F57N, V97N/K99T, R186N/K188T. Данные мутеины могут быть получены и исследованы, как описано в данном документе.

Пример 5.

Данная таблица обобщает результаты экспрессии и ингибирования ММР, полученные при экспрессии множественных мутеинов TIMP-3 в клетках млекопитающих. Данные по "Экспрессии у млекопитающих в сравнении с ДТ" обозначены как "+", указывая на то, что экспрессия была практически на том же уровне, что и для TIMP-3 дикого типа (или нативного); "++" указывает на то, что экспрессия повышалась до 2-4 раз по сравнению с полученными данными для TIMP-3 дикого типа, и "+++" указывает на повышении экспрессии до 4 раз по сравнению с TIMP-3 дикого типа. Обозначение "---" в столбце, относящееся к ферментативному ингибированию, указывает на то, что указанные исследования не проводили. Повышение уровня экспрессии, что подтверждалось кратным повышением экспрессии по сравнению с тем, что наблюдалось для TIMP-3 дикого типа, измеряли как качественно с применением вестерн-блоттинга или SDS-PAGE с окрашиванием гелей Кумасси, так и путем измерения титров экспрессии за счет измерения, применяя ридер ForteBio Octet®, применяя anti-TIMP-3 антитела, связывающие TIMP-3 (указанные антитела являются общедоступными, например в EMD Millipore, Billerica, MA: AbCam®, Cambridge, MA:, или R&D Systems, Minneapolis, MN).

Таблица 1

Мутеин TIMP-3 (SEQ ID NO)	Выход мутеина TIMP-3	Поддержание ингибирования MMP2, 9 или 13
K45E, K49S; (SEQ ID NO: 5)	+	---
K45E, K49E; (SEQ ID NO: 6)	+	---
K45E, T63E; (SEQ ID NO: 7)	+	---
K45E, Q80E; (SEQ ID NO: 8)	+	---
K45E, T63E, H78E; (SEQ ID NO: 10)	+	---
T63E, H78E, Q80E; (SEQ ID NO: 11)	+	---
K45E, T63E, H78E, Q80E; (SEQ ID NO: 12)	+	---
T63E, T74E, H78E; (SEQ ID NO: 13)	++	Обнаружено
T63E, T74E, H78D; (SEQ ID NO: 14)	++	---
L51T, T74E, H78D; (SEQ ID NO: 53)	+	---
T74E, H78E, Q80E; (SEQ ID NO: 16)	+	---
T74E, H78D, Q80E; (SEQ ID NO: 17)	+	---
K45N, V47T; (SEQ ID NO: 26)	+	---
K65N, M67T; (SEQ ID NO: 37)	++	---
K45N, V47T, T63E, T74E, H78E; (SEQ ID NO: 18)	++	Обнаружено
K49N, L51T, T63E, T74E, H78E; (SEQ ID NO: 19)	++	---
K45E, K49N, L51T, T63E; (SEQ ID NO: 20)	+	---
K49N, L51T, T74E, H78E; (SEQ ID NO: 21)	++	---
K49N, L51T; (SEQ ID NO: 27)	++	---
K50N, V52T; (SEQ ID NO: 30)	++	Обнаружено
L51N, K53T; (SEQ ID NO: 54)	++	---
F57N; (SEQ ID NO: 33)	+++	Обнаружено
P56N, G58T; (SEQ ID NO: 31)	+++	Обнаружено

T63N, K65T; (SEQ ID NO: 36)	++	Обнаружено
P56N, G58T, T63N, K65T; (SEQ ID NO: 32)	+++	Обнаружено
K75N, P77T; (SEQ ID NO: 38)	++	---
H78N, Q80T; (SEQ ID NO: 39)	++	---
K94N, E96T; (SEQ ID NO: 40)	++	Обнаружено
E96N, N98T; (SEQ ID NO: 41)	+	---
V97N, K99T; (SEQ ID NO: 42)	+	---
D110N, K112T; (SEQ ID NO: 43)	++	---
Q126N; (SEQ ID NO: 44)	++	---
R138N, H140T; (SEQ ID NO: 46)	+	---
R138T; (SEQ ID NO: 45)	++	Обнаружено
T158N, K160T; (SEQ ID NO: 47)	+	---
T166N, M168T; (SEQ ID NO: 48)	+	---
G173T; (SEQ ID NO: 49)	++	Обнаружено
H181N, A183T; (SEQ ID NO: 50)	+	---
R186N, K188T; (SEQ ID NO: 51)	+	---
P201N, K203T; (SEQ ID NO: 52)	+	---
A208Y; (SEQ ID NO: 55)	+	---
A208V; (SEQ ID NO: 56)	+	---
K45S, F57N; (SEQ ID NO: 23)	+++	Обнаружено
K49S, F57N; (SEQ ID NO: 28)	+++	Обнаружено
K68S, F57N; (SEQ ID NO: 34)	+++	Обнаружено
K133S, F57N; (SEQ ID NO: 35)	+++	Обнаружено
K45S, K133S, F57N; (SEQ ID NO: 24)	+++	Обнаружено
K49S, K68S, F57N (SEQ ID NO: 29).	+++	Обнаружено

Некоторые из этих мутаций проявляли повышенную экспрессию по сравнению с TIMP-3 дикого типа в клетках млекопитающих: T63E, T74E, H78E; T63E, T74E, H78D; K65N, M67T; K45N, V47T, T63E, T74E, H78E; K49N, L51T, T63E, T74E, H78E; K49N, L51T, T74E, H78E; K49N, L51T; K50N, V52T; L51N, K53T; T63N, K65T; K75N, P77T; H78N, Q80T; K94N, E96T; D110N, K112T; Q126N; R138T; G173T; F57N; P56N, G58T; P56N, G58T; T63N, K65T; K45S, F57N; K49S, F57N; K68S, F57N; K133S, F57N; K45S, K133S, F57N и K49S, K68S, F57N. Среди них, подгруппа (F57N; P56N, G58T; P56N, G58T; T63N, K65T; K45S, F57N; K49S, F57N; K68S, F57N; K133S, F57N; K45S, K133S, F57N и K49S, K68S, F57N) экспрессировались сильнее в 4 раза или выше, чем наблюдалось для TIMP-3 дикого типа.

Показано детальное сравнение активности MMP для некоторых мутеинов и TIMP-3 дикого типа (ДТ); данные результаты приведены ниже.

Таблица 2

Мутеин TIMP-3	MMP2 IC50 (M)	MMP9 IC50 (M)	MMP13 IC50 (M)
ДТ	$0,6 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-9}$	$0,9 \times 10^{-9}$
F57N	$0,5 \times 10^{-9}$	$4,6 \times 10^{-9}$	$0,5 \times 10^{-9}$
P56N, G58T	$1,0 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^{-9}$	$3,1 \times 10^{-9}$
T63N, K65T	$0,8 \times 10^{-9}$	$0,5 \times 10^{-9}$	$2,2 \times 10^{-9}$
K45S, F57N	$0,3 \times 10^{-9}$	$4,0 \times 10^{-9}$	н.п.

Пример 6.

Данный пример описывает анализ определения способности белка TIMP-3 связывать клетки НТВ-94™ (клеточная линия хондроцитов доступна из Американской коллекции типовых культур, Manassas, VA) с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS). Клетки НТВ-94 культивировали в культуральной среде для НТВ-94 (высокоглюкозная минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM), содержащая фетальную бычью сыворотку (10%) [FBS] и 2 мМ/л L-глутамин) при 37°C в 5% CO₂. Клетки засевали при плотности клеток $2,5 \times 10^4$ клеток/мл в стандартные колбы для тканевых культур на 6-12 недель до окрашивания и пересевали каждые 3-4 дня путем перенесения из колбы до трипсинизации). За около 16 ч до окрашивания для проведения флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS) клетки НТВ-94 засевали (100000 кле-

ток на лунку) в стандартные 12-луночные планшеты для тканевых культур в 2 мл среды НТВ94 и инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Перед окрашиванием содержание конфлюэнтных клеток было на уровне 80-90%.

Через около 16 ч культуральную среду НТВ94 удаляли из 12-луночных планшетов путем аспирации и в каждую лунку вносили 1 мл буфера для окрашивания (4°C) (натрий-фосфатный буфер [PBS], 2% FBS 0,15% NaN₃). Планшеты для клеточных культур инкубировали на протяжении 1 ч на льду. Буфер для окрашивания аспирировали и вносили меченые белки TIMP-3 HIS-Мус (как природные TIMP-3, так и вариант TIMP-3), растворенные в буфере для окрашивания до 80 мкг/мл, 0,9 мл/лунку; тот же объем буфера вносили в лунку в качестве негативного контроля. Клеточные культуры в планшетах инкубировали 30 мин на льду, аспирировали и дважды смывали буфером для окрашивания (1 мл/лунку). После второго смывания буфер аспирировали и вносили 0,9 мл/лунку мышинового анти-пента-HIS AlexaFluor488-конъюгированного антитела (Qiagen, Valencia, CA), растворенного в буфере для окрашивания до 20 мкг/мл, 0,9 мл/лунку. Параллельно, окрашенный негативный контрольный образец нерелевантного конъюгированного антитела mIgG₁ AlexaFluor488 (eBioscience, San Diego, CA), растворенного в буфере для окрашивания до 20 мкг/мл, вносили параллельно в репликационную лунку, окрашенную известным связывающим TIMP3 HIS-Мус (например, K45S, F57N, SEQ ID NO:23).

Клеточные культуры в планшетах инкубировали на протяжении 30 мин на льду без доступа света, аспирировали и дважды отмывали буфером для окрашивания (1 мл/лунку). После второго отмывания буфер аспирировали, вносили 1 мл/лунку буфера для диссоциации клеток (без ферментов, PBS, номер по каталогу # 13151-014; Life Technologies, Grand Island NY). Клеточные культуры в планшетах инкубировали на протяжении 5 мин при 37°C и клетки переносили в пробирки с 4 мл FACS. Лунки планшета отмывали PBS (1 мл/лунку, 25°C) и полученный раствор вносили в соответствующие пробирки с FACS, содержащие клетки в буфере для диссоциации. Пробирки центрифугировали на протяжении 5 мин при 1000 об/мин для получения конгломерата клеток и аспирировали. Клетки ресуспендировали в 300 мкл 4% параформальдегида в PBS (PFA) и выдерживали при 4°C в условиях без доступа света до проведения FACS.

Через два дня окрашивания TIMP-3 обнаруживали 8000 фиксированных событий в клетках НТВ94, например, на Becton Dickinson FACS Calibur, используя FL1 для обнаружения флуоресценции AlexaFluor488. Детектор прямого светорассеяния (FSC) устанавливали на E00 и детектор бокового светорассеяния (SSC) устанавливали на 316. Используясь совместно, эти детекторы измеряют свет, отраженный от клеток, как "рассеяния вперед" и "рассеянный вбок", которые позволяют определить гейт клеток НТВ-94, также называемые "закрытыми", и отделенными от неклеточного материала в пробирку в зависимости от размера и гранулярности клетки. Напряжение детектора FL1 устанавливается в значении 370. Анализ сделан, например, с помощью FlowJo vX.0.6.

Подобным образом анализировали несколько вариантов TIMP-3 на способность связываться с клетками НТВ-94; результаты двух отдельных экспериментов показаны в табл. 3 ниже (н.и. = не используется; н.п. = исследование не проводили). Девять гликовариантов TIMP-3, меченных HIS-Мус, не проявляли связывание с клетками НТВ-94, при этом для описанного способа регистрации сигнала FL1 не наблюдалось. Результаты представлены ниже в табл. 3.

Пример 7.

Данная таблица обобщает результаты экспрессии и ингибирования MMP, полученных при экспрессии множественных мутеинов TIMP-3 в клетках млекопитающих.

Таблица 3

Экспрессия и активность мутеинов TIMP-3

Вариант гипергликози- лирования	Выход мутеина TIMP-3 ¹	Поддержание ингибирования MMP2, 9 или 13 ²	Сдвиг ингиби- рования MMP2 ³	Сдвиг ингиби- рования MMP9 ³
K45S, F57N, I205F, A208G (SEQ ID NO:57)	++	н.п.	н.п.	н.п.

K45S, F57N, A208G (SEQ ID NO:58)	++	н.п.	н.п.	н.п.
K45S, F57N, I205Y (SEQ ID NO:59)	++	н.п.	н.п.	н.п.
K45S, F57N, I205Y, A208G (SEQ ID NO:60)	++	н.п.	н.п.	н.п.
K45N,V47T,F57N,K7 5N,P77T,K94N,E96T ,R138T,G173T (SEQ ID NO:61)	+	Обнаружено	7	25
K45N,V47T,F57N,K9 4N,E96T,R138T,G17 3T (SEQ ID NO:62) :	++	Обнаружено	5	15
K45N,V47T,K50N,V5 2T,F57N,V97N,K99T (SEQ ID NO:63)	-	н.п	н.п	н.п
K45S,K50N,V52T,F5 7N,V97N,K99T,R186 N,K188T (SEQ ID NO:64)	-	н.п	н.п	н.п
K45S,F57N,K94N,E9 6T,D110N,K112T,R1 38T,G173T (SEQ ID NO:65)	+	Обнаружено	6	24
K45S,F57N,T63N,K6 5T,K94N,E96T,G173 T (SEQ ID NO:66)	+	Обнаружено	2	16
K45N,V47T,K50N,V5 2T,F57N,V97N,K99T ,R138T,R186N,K188 T (SEQ ID NO:67)	-	н.п.	н.п.	н.п.

K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, Q126N, R138T (SEQ ID NO: 68)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 69)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, V97N, K99T, R138T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 70)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 71)	+++	Обнаружено	5	18
K45S, F57N, K75N, P77T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 72)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, V97N, K99T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 73)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45E, F57N, Q126N, R138T, G173T (SEQ ID NO: 74)	++	Обнаружено	4	8
K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 75)	++	Обнаружено	8	16
K45S, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R138T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 76)	-	н.п.	н.п.	н.п.

K45S.K50N,V52T,F57N,V97N,K99T,G173T,R186N,K188T (SEQ ID NO:77)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:78)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T (SEQ ID NO:79)	++	Обнаружено	3	8
K45N, V47T, F57N, V97N, K99T, R138T, G173T (SEQ ID NO:80)	++	Обнаружено	6	8
K45N, V47T, F57N, K99E G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:81)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45E, K49E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:82)	+	Обнаружено	1	5
K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:83)	++	Обнаружено	2	1

K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T (SEQ ID NO:84)	+	Обнаружено	2	1
K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:85)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45E, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T , G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:86)	-	н.п.	н.п.	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q (SEQ ID NO:87)	+++	Обнаружено	3	12
K45S F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:88)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:89)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T G173T (SEQ ID NO:90)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186Q, K188Q (SEQ ID NO:91)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению

K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186E (SEQ ID NO:92)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T K188E (SEQ ID NO:93)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186N, K188T (SEQ ID NO:94)	-	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E K50N, V52T K94N, E96T D110N, K112T R138T G173T (SEQ ID NO:95)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K45E K50N, V52T K94N, E96T R138T G173T K188E (SEQ ID NO:96)	+	Подлежит определению	Подлежит опреде- лению	Подлежит опреде- лению
K50N, V52T F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:97)	++	Обнаружено	2	91
K50N, V52T F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T (SEQ ID NO:98)	+++	Обнаружено	1	70
K45E F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T (SEQ ID NO:99)	++	Обнаружено	1	128

1 - выход относится к выходу TIMP-3 дикого типа (ДТ);

"-" указывает на то, что наблюдаемые уровни экспрессии были ниже по сравнению с уровнями экспрессии TIMP-3 дикого типа;

"+" указывает на то, что уровни были схожи с уровнями экспрессии TIMP-3 дикого типа;

"++" и "+++" указывают, что уровни экспрессии выше и значительно выше, чем данный показатель для TIMP-3 дикого типа;

2 - активность в пределах 10-кратной активности TIMP-3 ДТ;

3 - сдвиг представляет собой кратное снижение (увеличение) активности относительно соответствующей ММР.

Данная таблица обобщает сайты гликозилирования и другие характеристики множественных мутантов TIMP-3, экспрессирующихся в клетках млекопитающих.

Таблица 4

Гликозилирование и характеристика мутеинов TIMP-3

Варианты гликозилирования	# сайтов N-гликозилирования ⁴	Гепариновая независимость ⁵	Связывание НТВ-94
K45S, F57N, I205F, A208G (SEQ ID NO:57)	1*	Не обнаружено	Не обнаружено
K45S, F57N, A208G (SEQ ID NO:58)	1*	Не обнаружено	Не обнаружено
K45S, F57N, I205Y (SEQ ID NO:59)	1*	Не обнаружено	н.п.
K45S, F57N, I205Y, A208G (SEQ ID NO:60)	1*	Не обнаружено	н.п.
K45N, V47T, F57N, K75N, P77T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:61)	6	Частично	Не обнаружено
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:62) :	5	Частично	Не обнаружено
K45N, V47T, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T (SEQ ID NO:63)	4	Частично	н.п.

K45S, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 64)	4	Частично	н.п.
K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 65)	5	Частично	н.п.
K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, G173T (SEQ ID NO: 66)	4	Частично	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R138T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 67)	6	Частично	н.п.
K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, Q126N, R138T (SEQ ID NO: 68)	5	Частично	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 69)	5	Частично	н.п.
K45N, V47T, K50N, V52T, V97N, K99T, R138T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 70)	5	Частично	н.п.
K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 71)	5	Частично	Не обнаружено
K45S, F57N, K75N, P77T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 72)	5	Частично	н.п.

K45N, V47T, K50N, V52T, V97N, K99T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 73)	5	Частично	н.п.
K45E, F57N, Q126N, R138T, G173T (SEQ ID NO: 74)	4	Частично	Не обнаружено
K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 75)	5	Частично	Не обнаружено
K45S, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R138T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 76)	5	Частично	н.п.
K45S, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 77)	5	Частично	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 78)	5	Обнаружено	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T (SEQ ID NO: 79)	5	Обнаружено	н.п.
K45N, V47T, F57N, V97N, K99T, R138T, G173T (SEQ ID NO: 80)	5	Обнаружено	н.п.

K45N, V47T, F57N, K99E G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:81)	4	Обнаружено	Не обнаружено
K45E, K49E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:82)	5	Обнаружено	Не обнаружено
K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T (SEQ ID NO:83)	4	Обнаружено	н.п.
K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T (SEQ ID NO:84)	5	Обнаружено	н.п.
K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:85)	5	Обнаружено	н.п.
K45E, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T ,G173T, R186N, K188T (SEQ ID NO:86)	5	Обнаружено	н.п.
K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q (SEQ ID NO:87)	5	Обнаружено	н.п.
K45S F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:88)	4	Подлежит определению	Подлежит определению

K45E F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:89)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T G173T (SEQ ID NO:90)	5	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186Q, K188Q (SEQ ID NO:91)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186E (SEQ ID NO:92)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T K188E (SEQ ID NO:93)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T R138T G173T R186N, K188T (SEQ ID NO:94)	5	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E K50N, V52T K94N, E96T D110N, K112T R138T G173T (SEQ ID NO:95)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E K50N, V52T K94N, E96T R138T G173T K188E (SEQ ID NO:96)	4	Подлежит определению	Подлежит определению
K50N, V52T F57N K94N, E96T R138T G173T (SEQ ID NO:97)	5	Подлежит определению	Подлежит определению
K50N, V52T F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T (SEQ ID NO:98)	5	Подлежит определению	Подлежит определению
K45E F57N K94N, E96T D110N, K112T R138T (SEQ ID NO:99)	4	Подлежит определению	Подлежит определению

4 - число представляет собой число сайтов N-гликозилирования, встроенных в мутеин, дополнительно к природным сайтам N-гликозилирования;

5 - гепариновая независимость представляет собой характеристику (обнаружено/не обнаружено), что указывает на выделение мутеина TIMP-3 в культуральную среду при отсутствии гепарина, как описано в примере 2;

* мутации в остатках 208 и/или 205 проводили для стимуляции гликозилирования в природных сайтах N-гликозилирования в TIMP-3.

Рассматриваются дополнительные мутеины, включающие

K45S,
F57N, D110N, K112T; K45S, F57N, H78N, Q80T, D110N, K112T; K45S,
F57N, H78N, Q80T, D110N, K112T, Q126N; K45S, F57N, H78N, Q80T,
K94N, E96T Q126N; K45S, F57N, H78N, Q80T, Q126N, G173T; K45S,
F57N, T63N, K65T; K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T; K45S,
F57N, T63N, K65T, R138T, G173T; K45N, V47T, F57N, T63N, K65T,
R138T, G173T; K45S, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T; K45N,
V47T, F57N, T63N, K65T, K94N, E96T, R138T; K45S, F57N, Q126N,
R138T, G173T; P56N, G58T, T63N, K65T, K94N, E96T, Q126N, G173T;
P56N, G58T, T63N, K65T, D110N, K112T, Q126N, G173T; K49S, K50N,
V52T, K53E, V97N, K99T, R186N, K188T; K50N, V52T, V97N, K99T,
R186N, K188T; K49E, K53E, K188Q; K50N, V52T, R186N, K188T;
K50N, V52T, F57N, R186N, K188T; K45S, K50N, V52T, F57N, R186N,
K188T; K50N, V52T, F57N, T63N, K65T, R186N, K188T; K45S, K50N,
V52T, F57N R186N, K188T; K45S, K49S, K50N, V52T, F57N R186N,
K188T; K49S, K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R186N, K188T; K45S,
K50N, V52T, F57N, V97N, K99T, R186N, K188T; K45E, K50N, V52T,
D110N, K112T, R138T, G173T, K188E; K45E, F57N, D110N, K112T,
R138T, G173T, K188E; K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N,
K112T, G173T, K188E; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T,
G173T, K188E; K45E, K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, G173T,
R186N, K188T; K45E, F57N, D110N, K112T, R138T, G173T, R186N,
K188T; K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186N, K188T; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186N, K188T; K45E, K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, G173T,
R186Q, K188Q; K45E, F57N, D110N, K112T, R138T, G173T, R186Q,
K188Q; K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186Q, K188Q; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186Q, K188Q; K45E, K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, K188E;
K45E, F57N, D110N, K112T, R138T, K188E; K45E, K50N, V52T, K94N,
E96T, D110N, K112T, K188E; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N,
K112T, K188E; K45E, K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, R186N,
K188T; K45E, F57N, D110N, K112T, R138T, R186N, K188T; K45E,
K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T; K45E, F57N,
K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T; K45E, K50N, V52T,
D110N, K112T, R138T, R186Q, K188Q; K45E, F57N, D110N, K112T,
R138T, R186Q, K188Q; K45E, K50N, V52T, K94N, E96T, D110N,
K112T, R186Q, K188Q; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T,
R186Q, K188Q; K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, G173T, K188E;
K45S, F57N, D110N, K112T, R138T, G173T, K188E; K50N, V52T,
K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, K188E; K45S, F57N, K94N, E96T,
D110N, K112T, G173T, K188E; K50N, V52T, D110N, K112T, R138T,
G173T, R186N, K188T; K45S, F57N, D110N, K112T, R138T, G173T,
R186N, K188T; K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186N, K188T; K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T,
R186N, K188T; K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, G173T, R186Q,
K188Q; K45S, F57N, D110N, K112T, R138T, G173T, R186Q, K188Q;
K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q;
K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q;
K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, K188E; K45S, F57N, D110N,
K112T, R138T, K188E; K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T,
K188E; K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, K188E; K50N, V52T,
D110N, K112T, R138T, R186N, K188T; K45S, F57N, D110N, K112T,
R138T, R186N, K188T; K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T,
R186N, K188T; K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N,

K188T; K50N, V52T, D110N, K112T, R138T, R186Q, K188Q; K45S, F57N, D110N, K112T, R138T, R186Q, K188Q; K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T; K50N, V52T, K94N, E96T, R138T, G173T; K45E, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T; K45E, F57N, K94N, E96T, R138T, G173T; K45S, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T; K45S, F57N, K94N, E96T, R138T, G173T; K45N, V47T, , H78N, Q80T, Q126N, R186Q, K188Q; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, Q126N, R186Q, K188Q; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, Q126N, ; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, Q126N, R138T; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K50N, V52T, K94N, E96T, H78N, Q80T, R138T; K50N, V52T, K94N, E96T, H78N, Q80T, R138T, R186Q, K188Q; K45E, F57N, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, F57N, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, F57N, H78N, Q80T, R186Q, K188Q; K45S, F57N, H78N, Q80T, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, R186Q, K188Q; K50N, V52T, K94N, E96T, H78N, Q80T, R138T, ; K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T; K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q; и K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T, K188Q.

Дополнительные мутеины включают

K50N, V52T, P56N, G58T, R186N, K188T; K45S, K50N, V52T, P56N, G58T, R186N, K188T; K50N, V52T, P56N, G58T, T63N, K65T, R186N, K188T; K45S, K50N, V52T, P56N, G58T R186N, K188T; K45S, K49S, K50N, V52T, P56N, G58T R186N, K188T; K49S, K50N, V52T, P56N, G58T, V97N, K99T, R186N, K188T; K45S, K50N, V52T, P56N, G58T, V97N, K99T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, K188E; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, K188E; K45E, K50N, V52T, D110N, K112T , R138T, G173T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, R186Q, K188Q; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q; K45E, P56N, G58T,

D110N, K112T, R138T, K188E; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, K188E; K45E, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T; K45E, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, R186Q, K188Q; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, K188E; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, K188E; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, R186N, K188T; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186N, K188T; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, G173T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, G173T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, K188E; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, K188E; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R138T, R186N, K188T; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186N, K188T; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R186N, K188T; K45S, P56N, G58T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T; K45E, P56N, G58T, K94N, E96T, R138T, G173T; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T, G173T; K45S, P56N, G58T, K94N, E96T, R138T, G173T; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, Q126N, R186Q, K188Q; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, Q126N, ; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, Q126N, R138T; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45E, P56N, G58T, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, P56N, G58T, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, P56N, G58T, H78N, Q80T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, H78N, Q80T, Q126N, R138T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, R186Q, K188Q; K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q, K188Q; K45S, P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T; K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, R186Q; и K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, E96T, D110N, K112T, K188Q.

Данные мутеины получают и исследуют, как описано выше в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный мутеин тканевого ингибитора металлопротеиназы-3 (TIMP-3), обладающий активностью ингибитора MMP, где указанный мутеин демонстрирует ингибирующую активность к MMP2 или MMP9 по сравнению с TIMP-3 дикого типа, где указанный мутеин имеет зрелый участок TIMP-3, представленный в SEQ ID NO:2, имеющий по меньшей мере одну мутацию, выбранную из K45S и F57N.

2. Выделенный мутеин TIMP-3, обладающий активностью ингибитора MMP, где указанный мутеин демонстрирует ингибирующую активность к MMP2 или MMP9 и имеет зрелый участок TIMP-3, представленный в SEQ ID NO:2, имеющий мутации F57N и K45S.

3. Мутеин TIMP-3 по пп.1 и 2, отличающийся тем, что в результате дополнительной мутации в аминокислотную последовательность вводится N-связанный сайт гликозилирования.

4. Выделенный мутеин TIMP-3, обладающий активностью ингибитора MMP, где указанный мутеин демонстрирует гепарин-независимую ингибирующую активность к MMP2 или MMP9 по сравнению с TIMP-3 дикого типа, где указанный мутеин имеет зрелый участок TIMP-3, представленный в SEQ ID NO:2, причем мутеин имеет по меньшей мере две мутации, выбранные из K45S и F57N.

5. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутеин TIMP-3 по любому из пп.1-4.

6. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.5.

7. Выделенная клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная с помощью вектора экспрессии по п.6.

8. Способ получения рекомбинантного мутеина TIMP-3, включающий культивирование трансформированной или трансфицированной клетки-хозяина по п.7 в условиях, способствующих экспрессии мутеина TIMP-3, и выделение мутеина TIMP-3.

9. Композиция для лечения состояния, в котором матриксные металлопротеиназы (MMP) и/или другие протеиназы, ингибированные или ингибируемые TIMP-3, играют причинную или усугубляющую

роль, содержащая мутеин TIMP-3 по любому из пп.1-4 и физиологически приемлемый растворитель, вспомогательное вещество или носитель.

10. Применение композиции по п.9 для получения лекарственного средства, пригодного для лечения состояния, в котором матриксные металлопротеиназы (ММП) и/или другие протеиназы, ингибированные или ингибируемые TIMP-3, играют причинную или усугубляющую роль.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительных состояний, остеоартрита, ишемии миокарда, реперфузионного повреждения и развития застойной сердечной недостаточности.

12. Применение по п.10, отличающееся тем, что состояние выбирают из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и идиопатического фиброза легких (ИФЛ), воспалительного заболевания кишечника (например, неспецифического язвенного колита, болезни Крона и целиакии), псориаза, миокардита, включая вирусный миокардит, воспаления, связанного с атеросклерозом, и артритов, включая ревматоидный артрит и псориатический артрит.

13. Применение по п.10, отличающееся тем, что состояние выбирают из группы, состоящей из следующего: дистрофический буллезный эпидермолиз, остеоартрит, псевдоподагра, ревматоидный артрит, включая ювенильный ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, заболевание периодонта, язва, включающая язву роговицы, эпидермиса или желудка, заживление ран после операций, рестеноз, эмфизема, болезнь Педжета, остеопороз, склеродермия, компрессионная атрофия кости или тканей (при пролежнях), холестеатома, патологическое заживление ран, олигоартикулярный ревматоидный артрит, ревматоидный полиартрит, начало системного ревматоидного артрита, анкилозирующий спондилит, энтеропатический артрит, реактивный артрит, синдром Рейтера, SEA-синдром (серонегативность, энтезопатия, артропатический синдром), дерматомиозит, псориатический артрит, склеродермия, системная красная волчанка, васкулиты, миозит, полимиозит, дерматомиозит, остеоартрит, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, артериит, ревматическая полимиалгия, саркоидоз, склероз, первичный билиарный склероз, склерозирующий холангит, синдром Шегрена, псориаз, пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, псориаз складок, пустулезный псориаз, псориатическая эритродермия, дерматит, атопический дерматит, атеросклероз, волчанка, болезнь Стилла, системная красная волчанка (СКВ), тяжелая псевдопаралитическая миастения, воспалительное заболевание кишечника, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, целиакия (болезнь глютеновой недостаточности), энтеропатия, связанная с серонегативными артропатиями, микроскопический или коллагеновый колит, эозинофильный гастроэнтерит или резервуарный илеит, возникающий после проктоколэктомии и повздошно-анального анастомоза, панкреатит, инсулинзависимый сахарный диабет, мастит, холецистит, холангит, перихолангит, рассеянный склероз (РС), астма (в том числе экзогенная и эндогенная астма, а также связанные с ними хронические воспалительные заболевания или гиперчувствительность дыхательных путей), хроническая обструктивную болезнь легких (ХОБЛ, например хронический бронхит, эмфизема), острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), респираторный дистресс-синдром, муковисцидоз, легочная гипертензия, легочная вазоконстрикция, острое повреждение легких, аллергический бронхолегочный аспергиллез, гиперсенситивный пневмонит, эозинофильная пневмония, бронхит, аллергический бронхит, бронхоэктатическая болезнь, туберкулез, аллергический пневмонит, профессиональная астма, астма как расстройство, саркоид, реактивная болезнь (или дисфункции) дыхательных путей, биссиноз, интерстициальная болезнь легких, гиперэозинофильный синдром, ринит, синусит и паразитарные болезни легких, гиперреактивность дыхательных путей, вызванная вирусами (например, респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом парагриппа (PIV), риновирусами (RV) и аденовирусом), болезнь Гийена-Барре, болезнь Грейвса, болезнь Аддисона, синдром Рейно, аутоиммунный гепатит, реакция трансплантата против хозяина (РТПХ), церебральная ишемия, черепно-мозговая травма, рассеянный склероз, невропатия, миопатия, повреждение спинного мозга и боковой амиотрофический склероз (БАС).

```

1      11      21      31      41      51
MTFWLGLLVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAKVVGKK LVKEGPFGL
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXCTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAXVXGXX XXKXGXXXTL

61      71      81      91      101     111
VYTIKQMKMY RGFTKMPHVQ YIHTASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GRMYTGLCNF
VYIXQXMY RGFXMXXVX YIHTASESL CGLXLXXXY QYLLTGRVYX GXMYTGLCNF

121     131     141     151     161     171
VERWDQLTSL QRKGLNYRYH LGCNCKIKSC YYLPCFVTSK NECLWTDMLS NFGYPGYQSK
VERWDXLTL QRKGLNYRYH LGCNCKIKSC YYLPCFVTSK NECLWDXLS NFXYPGYQSK

181     191     201     211
HYACIRQGG YCSWYRGWAP PDKSIINATD P
XXXCIXQXGG YCSWYRGWAP XDXSIINXTD P

```

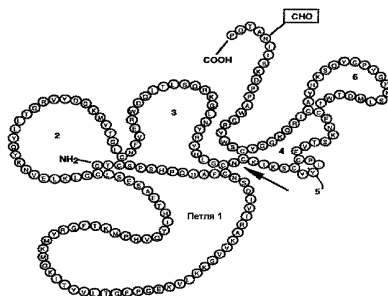
Фиг. 1

```

1      11      21      31      41      51
MTPWLGGLIVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAKVVGKK LVKEGPFGLT
          *X*XX*  *X*****X*  **X*XX*XX*  X*XX*****
61      71      81      91      101     111
VYTIKQMKMY  RGFTKMPHVQ YIITEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF
**X**XX**  *****X*  *****  *****X***  *****
121     131     141     151     161     171
VERWDQLTLS  QRKGLNYRYH LGCNCKIKSC YYLPCFVTSK NECLWTDMLS NFGYFGYQSK
*****  *****  *****  *****  *****  *****
181     191     201     211
HYACIRQKGG  YCSWYRGWAP PDKSIINATD P
*****  *****  *X*****X*  *

```

Фиг. 2



Фиг. 3

```

1      11      21      31      41      51
MTPWLGGLIVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAKVVGKK LVKEGPFGLT
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXCTCSPSH PQDAFCNSDI VIXXVVGKK LVXXGPFGLT
61      71      81      91      101     111
VYTIKQMKMY  RGFTKMPHVQ YIITEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF
VYTIQXXMY  XXXXXXXXVQ YIITEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF
121     131     141
VERWDQLTLS  QRKGLNYRYH LGCN
VERWDQLTLS  QRKGLNYRYH LGCN

```

Фиг. 4

```

1      11      21      31      41      51
MTPWLGGLIVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAKVVGKK LVKEGPFGLT
XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX XXXAXXSXI XXXAXVXXK VXXGXGFGIX
61      71      81      91      101     111
VYTIKQMKMY  RGFTKMPHVQ YIITEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF
XXYIKQMKMY  RGFXKMPXVX YIITEASESL CGLKLEVNKY QYLLTGRVYD GKMYTXLXXF
121     131     141
VERWDQLTLS  QRKGLNYRYH LGCN
VERWDQLTLS  QRKGLNYRYH LGXX

```

Фиг. 5

```

1      50
TIMP-2  MGAARTLRL ALGLLLATL LRP. ADACS CSPVHFQQAF CNADVVIRAK
TIMP-3  ~~~~~M PW G IV GSWG GDWG E T S D S I
          * * * * *
51      100
TIMP-2  AVSEKEVDGSG NDIYGNPIKR IQYEIKQIKM FKGPEK. DI EFIYTAPSSA
TIMP-3  V GK L KE ..... FGT LV T M YR FT MPHV QY H EA ES
          * * * * *
101     150
TIMP-2  VCGVSLDVGK KKEYLIAGKA EGDGRMHITL CDFIVFWDTL STTOKKSINH
TIMP-3  L LK E .N YQ LT RV Y. YTG N VER Q TLS R G Y
          ** * * * *
151     200
TIMP-2  RYQMGCECKI TRCPMIPCYI SSPDECLWMD WYTEKNINGH QAKFFACIKR
TIMP-3  HL N KS YIL FV T KN T MLSNFGYP Y S HY RQ
          ** * * * *
201     224
TIMP-2  SDGSCAWYRG AAPPKQEFLO IEDP
TIMP-3  RQ Y S W DKSIIIN AT
          * * * * *

```

Фиг. 6

