

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041814**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.06

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890020

(22) Дата подачи заявки
2016.06.06

(54) ПРИМЕНЕНИЕ TIMP2 ПОЛИПЕПТИДА ИЛИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩЕЙ TIMP2 ПОЛИПЕПТИД, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ СОСТОЯНИЙ

(31) 62/175,981

(32) 2015.06.15

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/US2016/036032

(87) WO 2016/205004 2016.12.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ
ЗЕ ЛЕЛАНД СТЭНФОРД
ДЖУНИОР ЮНИВЕРСИТИ; Ю. С.
ГОВЕРНМЕНТ ЭЗ РЕПРЕЗЕНТИД
БАЙ ЗЕ ДЕПАРТМЕНТ ОФ
ВЕТЕРАНС ЭФФЭЙРС (US)**

(72) Изобретатель:
**Висс-Корэй Антон, Кастельяно
Джозеф М. (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Гизатулина Е.М., Карпенко
О.Ю., Строкова О.В. (RU)**

(56) US-A1-20100080850
US-A1-20030157687

ADAIR et al., Measurement of Gelatinase B (MMP-9) in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Vascular Dementia and Alzheimer Disease. Stroke. 2004, Vol. 35(6), p. e159-62. PDF File: pg. 1-5. Abstract; pg. 1, col. 2, top para; and pg. 3, col. 2, top para, and Fig. 1(B)

Kwak, Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. J. Exerc Rehabil. 2013, Vol. 9(3), p. 338-47. Entire documentation, especially. Abstract; pg. 340, Fig. 1; and pg. 341, col 1, middle para

WANG et al., Matrix Metalloproteinases and Their Multiple Roles in Alzheimer's Disease. Biomed. Res. Int. 2014, Vol. 2014:908636. Epub 2014 Jun 24. PDF File: pg. 1-8. Entire documentation, especially. Abstract

BABA et al., Timp-3 deficiency impairs cognitive function in mice. Lab. Invest. 2009, Vol. 89(12), p. 1340-7. PDF File: pg. 1-4. Entire documentation, especially. Abstract
US-A1-20040121438

(57) Предусмотрено применение тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (TIMP2) полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, для уменьшения ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности у взрослого млекопитающего, включающее введение TIMP2 полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, млекопитающему для достаточного усиления активности TIMP2 у млекопитающего для уменьшения у взрослого млекопитающего ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности.

041814 B1

041814 B1

Права правительства

Настоящее изобретение было выполнено при поддержке правительства в рамках контракта № AG045034, предоставленного национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Ссылка на родственные заявки

В соответствии с 35 U.S.C. §119 (e) согласно заявке на данное изобретение испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки на выдачу патента США с серийным номером 62/175981, поданной 15 июня 2015 г., раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Старение в организме сопровождается накоплением изменений с течением времени. В нервной системе старение сопровождается структурными и нейрофизиологическими изменениями, которые приводят к снижению когнитивных способностей и предрасположенности к дегенеративным расстройствам у здоровых индивидуумов (Heeden and Gabrieli, "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience", *Nat. Rev. Neurosci.* (2004), 5:87-96; Raz et al., "Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence from structural magnetic resonance imaging", *Neuropsychology* (1998), 12:95-114; Mattson and Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability", *Nat. Rev. Neurosci.* (2006), 7:278-294; и Rapp and Heindel, "Memory systems in normal and pathological aging", *Curr. Opin. Neurol.* (1994), 7:294-298). К этим изменениям относятся потеря синапсов и вызванная ею потеря функции нейронов. Таким образом, несмотря на то, что значительная гибель нейронов во время естественного процесса старения, как правило, не наблюдается, нейроны в стареющем головном мозге уязвимы к сублетальным возрастным изменениям в структуре, целостности синапсов и молекулярной переработке на уровне синапса, причем все из перечисленного нарушают когнитивную функцию.

В дополнение к нормальной потере синапсов в ходе естественного старения потеря синапсов представляет собой раннее патологическое явление, общее для многих нейродегенеративных состояний, и служит лучшим коррелятом нейронного и когнитивного нарушения, ассоциированного с этими состояниями. Действительно, старение остается единственным наиболее доминирующим фактором риска связанных с деменцией нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (AD) (Bishop et al., "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline", *Nature* (2010), 464:529-535 (2010); Heeden & Gabrieli, "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience", *Nat. Rev. Neurosci.* (2004), 5:87-96; Mattson & Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability", *Nat. Rev. Neurosci.* (2006), 7:278-294).

По мере увеличения продолжительности жизни человека всё большая часть населения страдает от ассоциированных с возрастом когнитивных нарушений, что делает крайне важным выяснение способов поддержания когнитивной целостности, защищая от последствий старения или даже противодействуя им (Hebert et al., "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census", *Arch. Neurol.* (2003), 60:1119-1122; Bishop et al., "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline", *Nature* (2010), 464:529-535).

Тканевой ингибитор металлопротеиназы 2 (TIMP2) представляет собой представителя группы специфических ингибиторов матриксных металлопротеиназ. Регулируемые указанными ингибиторами белки, матриксные металлопротеиназы (ММР), играют роль в некоторых физиологических процессах, включая в себя рост, заживление ран, восстановление тканей, а также развитие и гомеостаз клеток. Обширные категории ММР состоят из коллагеназ, желатиназ, стромелизинов, матрилизинов, ММР мембранного типа (М-ММР) и других типов. Указанные ферменты должны точно регулироваться, поскольку потеря контроля над активностью ММР может привести к артриту, злокачественной опухоли, атеросклерозу, аневризмам, нефриту, тканевым язвам, фиброзу и другому повреждению тканей (Visse and Nagase, "Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases", *Circulation Research* (2003), 92:827-39). У позвоночных идентифицировали четыре TIMP (1-4).

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Предусмотрено применение тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (TIMP2) полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, для уменьшения ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности у взрослого млекопитающего, включающее введение TIMP2 полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, млекопитающему для достаточного усиления активности TIMP2 у млекопитающего для уменьшения у взрослого млекопитающего ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности.

В одном из вариантов осуществления системную активность TIMP2 усиливают.

В одном из вариантов осуществления системное содержание TIMP2 у млекопитающего увеличивают.

В одном из вариантов осуществления применяют TIMP2 полипептида.

В одном из вариантов осуществления полипептид TIMP2 характеризуется последовательностью, которая является по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления применяют нуклеиновую кислоту, которая усиливает экспрессию TIMP2 полипептида по любому из пп.1 или 2.

В одном из вариантов осуществления млекопитающее представляет собой примата.

В одном из вариантов осуществления примат представляет собой человека.

В одном из вариантов осуществления возраст примата старше 50 лет.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А показаны результаты на срезах головного мозга, выделенных из организма старых мышей дикого типа, которые получили лечение с помощью рекомбинантного TIMP2 (i.p. (интраперитонеально), 50 мкг/кг) (нижняя часть) или контроля (верхняя часть).

На фиг. 1В представлено количественное определение фазы поддержания PSA (амплитуды популяционного спайка), показанных на фиг. 1 А.

На фиг. 2 показаны результаты лечения с помощью антитела к TIMP2 на различие предметов.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Предусмотрены способы лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего. Аспекты способов включают в себя усиление активности TIMP, например активности TIMP2, у млекопитающего в достаточной степени для лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего. Кроме того, предусмотрены композиции для применения в осуществлении способов согласно настоящему изобретению. Путем осуществления настоящих способов можно лечить разнообразные ассоциированные со старением состояния, причем состояния включают в себя когнитивные нарушения.

Прежде чем будут описаны настоящие способы и композиции, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретным описанным способом или композицией, поскольку они могут, разумеется, меняться. Кроме того, следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления, и не подразумевается, что она является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В тех случаях, когда предусмотрен диапазон значений, следует понимать, что также конкретно раскрыто каждое промежуточное значение, до десятой части нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределами указанного диапазона. Каждый меньший диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим заявленным или промежуточным значением в указанном диапазоне включен в настоящее изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов можно независимо включать в диапазон или исключать из него, и каждый диапазон, в котором любой, ни один или оба предела включены в меньшие диапазоны, также охватывается изобретением с учетом любого специально исключенного предела в заявленном диапазоне. Если указанный диапазон включает в себя один или оба предела, диапазоны, включающие любой или оба из указанных пределов, также включены в настоящее изобретение.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такие же значения, которые, как правило, понятны специалисту в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно использовать в осуществлении на практике или испытании настоящего изобретения, ниже описаны некоторые потенциальные и предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов в связи с тем, что процитировано в публикациях. Следует понимать, что настоящее раскрытие заменяет любое раскрытие включенной публикации в той степени, в которой существует противоречие.

Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, содержит отдельные компоненты и признаки, которые можно легко отделить или комбинировать с признаками любого из нескольких других вариантов осуществления, не отклоняясь от объема или сущности настоящего изобретения. Любой перечисленный способ можно осуществить в представленном порядке событий или в любом другом порядке, который является логически возможным.

Необходимо отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя определяемые объекты во множественном числе, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "клетку" включает в себя множество таких клеток, а ссылка на "пептид" включает в себя ссылку на один или несколько пептидов и их эквивалентов, например полипептидов, известных специалистам в настоящей области техники, и т.п.

Публикации, обсуждаемые в настоящем документе, представлены исключительно для их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не наделено правом предшествовать такой публикации на основании предыдущего изобретения. Кроме того, представленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые, возможно, необходимо будет подтвердить независимо.

Способы.

Как обобщено выше, аспекты настоящего изобретения включают в себя способы лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего. Ассоциированное со старением состоя-

ние может проявляться множеством различных путей, например в виде ассоциированного со старением когнитивного нарушения и/или физиологического нарушения, например в форме повреждения центральных или периферических органов организма, например, без ограничения: поражение клетки, повреждение ткани, дисфункция органа, ассоциированное со старением сокращение продолжительности жизни и карциногенез, при которых конкретные, представляющие интерес органы и ткани включают в себя, без ограничения, кожу, нейрон, мышцу, поджелудочную железу, головной мозг, почку, легкое, желудок, кишечник, селезенку, сердце, жировую ткань, яичко, яичник, матку, печень и кость; в форме пониженной нейронной пластичности и т.д.

Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное со старением состояние представляет собой ассоциированное со старением нарушение когнитивной способности у индивидуума, т.е. ассоциированное со старением когнитивное нарушение.

Под когнитивной способностью, или "познавательной способностью", подразумевают умственные процессы, которые включают в себя следующее: внимание и концентрация, обучение сложным задачам и понятиям, память (приобретение, сохранение и воспроизведение новой информации в краткосрочной и/или долгосрочной перспективе), обработка информации (обращение с информацией, собранной пятью чувствами), функция пространственного зрения (визуальное восприятие, восприятие глубины, использование психических образов, копирование рисунков, построение объектов или форм), порождение речи и ее понимание, беглость речи (подбор слов), решение проблем, принятие решений и исполнительные функции (планирование и определение приоритетов).

Под "снижением когнитивных способностей" подразумевают прогрессирующее снижение одной или нескольких из указанных способностей, например снижение функций памяти, речи, мышления, суждения и т.д.

Под "нарушением когнитивной способности" и "когнитивным нарушением" подразумевают снижение когнитивной способности относительно здорового индивидуума, например, совпадающего по возрасту здорового индивидуума, или относительно способности индивидуума в более ранний момент времени, например 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 5 лет или 10 лет назад или еще раньше. Ассоциированные со старением когнитивные нарушения включают в себя нарушения когнитивной способности, которые, как правило, ассоциированы со старением, включая в себя, например, когнитивное нарушение, ассоциированное с естественным процессом старения, например умеренное когнитивное нарушение (M.C.I.); и когнитивное нарушение, ассоциированное с расстройством, ассоциированным со старением, т.е. расстройством, которое наблюдается с увеличивающейся частотой с продолжением старения, например нейродегенеративное состояние, такое как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукома, мышечная дистрофия, сосудистая деменция и подобное.

Под термином "лечение" подразумевают, что достигается по меньшей мере уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с состоянием, ассоциированным со старением, поражающим взрослого млекопитающего, при этом уменьшение интенсивности используют в широком смысле для обозначения по меньшей мере снижения величины параметра, например, симптома, ассоциированного с подлежащим лечению нарушением. В связи с этим лечение также включает в себя ситуации, когда патологическое состояние или по меньшей мере симптомы, ассоциированные с ним, полностью ингибируются, например предотвращается их возникновение, или останавливаются, например прекращаются, так что взрослое млекопитающее больше не страдает от нарушения или по меньшей мере симптомов, которые характеризуют нарушение. В некоторых случаях "лечение", "осуществление лечения" и подобное относится к получению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может являться профилактическим в контексте полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может являться терапевтическим в контексте частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. "Лечение" может представлять собой любое лечение заболевания у млекопитающего и включает в себя следующее:

- (a) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может являться предрасположенным к заболеванию, но у которого еще не диагностировали его наличие;
- (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; или
- (c) устранение заболевания, т.е. стимулирование регрессии заболевания.

Лечение может приводить к разнообразию различных физических проявлений, например модуляции экспрессии генов, увеличенной синаптической эффективности, увеличенному нейрогенезу, омоложению ткани или органов и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления происходит лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или снижает нежелательные клинические симптомы пациента. Такое лечение можно провести до полной потери функции пораженных тканей. Предусмотренную терапию можно вводить до симптоматической стадии заболевания, во время симптоматической стадии заболевания и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

В некоторых случаях, когда ассоциированное со старением состояние представляет собой ассоциированное со старением снижение когнитивных способностей, лечение с помощью способов согласно

настоящему раскрытию замедляет или снижает прогрессирование ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Иными словами, когнитивные способности у индивидуума снижаются медленнее, если вообще это происходит, после лечения с помощью раскрытых способов, чем до или при отсутствии лечения с помощью раскрытых способов. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию стабилизирует когнитивные способности индивидуума. Например, прогрессирование снижения когнитивных способностей у индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, останавливается после лечения с помощью раскрытых способов. Согласно другому примеру снижение когнитивных способностей у индивидуума, например индивидуума в возрасте 40 лет или старше, который, как предполагают, страдает от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, предотвращается после лечения с помощью раскрытого способа. Иными словами, наблюдают отсутствие (дальнейшего) когнитивного нарушения. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию снижает или вызывает обратное развитие когнитивного нарушения, например, что наблюдают по улучшению когнитивных способностей у индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Иными словами, когнитивные способности индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, после лечения с помощью раскрытых способов, становятся лучше, чем они были до лечения с помощью раскрытых способов, т.е. они улучшаются при лечении. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию устраняет когнитивное нарушение. Иными словами, когнитивные способности индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, восстанавливаются, например, до их уровня, когда возраст индивидуума составлял приблизительно 40 лет или меньше, после лечения с помощью раскрытых способов, например, что видно по улучшенным когнитивным способностям у индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей.

В некоторых случаях лечение взрослого млекопитающего согласно настоящим способам приводит к изменению в центральном органе, например органе центральной нервной системы, таком как головной мозг, спинной мозг и т.д., при этом изменение может проявляться множеством различных путей, например, как описано более подробно ниже, включая в себя, без ограничения, молекулярное, структурное и/или функциональное изменение, например, в форме усиленной синаптической пластичности. В некоторых случаях лечение субъекта согласно способам приводит к изменению в периферическом органе, таком как печень, мышца, сердце, кровь и т.д., при этом изменение может проявляться множеством различных путей, например, как описано более подробно ниже.

Как обобщенно представлено выше, описанные в настоящем документе способы представляют собой способы лечения ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше, у взрослого млекопитающего. Под взрослым млекопитающим подразумевается млекопитающее, которое достигло зрелости, т.е. которое является полностью развившимся. Таким образом, взрослые млекопитающие не являются млекопитающими ювенильного возраста. Виды млекопитающих, которых можно лечить с помощью настоящих способов, включают в себя собак и кошек; лошадей; крупный рогатый скот; овец и т.д.; а также приматов, включая в себя людей. Предусмотренные способы, композиции и реагенты также можно применять на животных моделях, включая в себя небольших млекопитающих, например мышей, зайцеобразных и т.д., например, в экспериментальных исследованиях. Приведенное ниже обсуждение будет сфокусировано на применении предусмотренных способов, композиций, реагентов, приборов и наборов для людей, но специалисту в настоящей области техники будет понятно, что такие описания можно легко модифицировать для других представляющих интерес млекопитающих на основании значений в настоящей области техники.

Возраст взрослого млекопитающего может варьировать в зависимости от типа млекопитающего, подлежащего лечению. Если взрослое млекопитающее представляет собой человека, возраст человека, как правило, составляет 18 лет или старше. В некоторых случаях взрослое млекопитающее представляет собой индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением нарушения, такого как ассоциированное со старением когнитивное нарушение, или подверженного риску его развития, если взрослое млекопитающее может представлять собой взрослое млекопитающее, который, как определили, например в форме постановки диагноза, страдает от ассоциированного со старением нарушения, такого как ассоциированное со старением когнитивное нарушение, или подвержен риску его развития. Фраза "индивидуум, страдающий от ассоциированного со старением когнитивного нарушения или подверженный риску его развития" относится к индивидууму, возраст которого составляет приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше и в некоторых случаях не старше чем 100 лет, например, 90 лет, т.е. в диапазоне возрастов, составляющем приблизительно 50-100 лет, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или приблизительно 90 лет. Индивидуум может страдать от ассоциированного со старением состояния, например когнитивного нарушения, ассоциированного с естественным процессом старения, например М.С.И. Альтернативно, возраст индивидуума может составлять 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и в некоторых случаях не старше чем 100 лет, т.е. в диапазоне возрастов, составляющем при-

близительно 50-100 лет, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет, и который еще не начал проявлять симптомы ассоциированного со старением состояния, например когнитивного нарушения. Согласно другим вариантам осуществления возраст индивидуума может являться любым, если индивидуум страдает от когнитивного нарушения вследствие ассоциированного со старением заболевания, например следующего: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукома, мышечная дистрофия, деменция и подобное. В некоторых случаях индивидуум представляет собой индивидуума любого возраста, у которого диагностировали ассоциированное со старением заболевание, которое, как правило, сопровождается когнитивным нарушением, например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височную деменцию, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, спинальную мышечную атрофию, рассеянный склероз, множественную системную атрофию, глаукому, атаксию, мышечную дистрофию, деменцию и подобное, при этом индивидуум еще не начал проявлять симптомы когнитивного нарушения.

Как обобщенно представлено выше, аспекты способов включают в себя усиление активности TIMP, например системной активности TIMP, у млекопитающего в достаточной степени для лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего. Под усилением активности TIMP подразумевается увеличение одной или нескольких целевых активностей TIMP у субъекта. В некоторых случаях активность TIMP, которая усиливается, представляет собой системную активность TIMP, под которой подразумевается активность TIMP в сердечно-сосудистой системе млекопитающего. Величина увеличения может варьировать, при этом в некоторых случаях величина увеличения является 2-кратной или больше, например, как 5-кратной или больше, включая в себя 10-кратную или больше, например, 15-кратную или больше, 20-кратную или больше, 25-кратную или больше (по сравнению с подходящим контролем). Активность TIMP, которая увеличивается путем осуществления на практике настоящих способов, представляет собой опосредованный TIMP процесс, который является благоприятным в лечении ассоциированного со старением состояния. Иными словами, активность TIMP, которая усиливается, представляет собой активность TIMP, которая приводит к лечению, например, как описано выше, ассоциированного со старением состояния у субъекта.

Целевая активность TIMP, которая усиливается, может варьировать. В некоторых случаях целевая активность TIMP представляет собой активность TIMP2, т.е. активность, проявляемую белком TIMP2. Таким образом, под активностью TIMP2 подразумевается представляющая интерес активность белка TIMP2, т.е. активность, которая приводит к лечению ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше. Интерес представляют белки TIMP2 млекопитающего, такого как, без ограничения, следующие: примат, например человек, представитель собачьих, представитель кошачьих, представитель лошадиных, представитель бычьих, овца, мышь, представитель зайцеобразных и т.д. Последовательность TIMP2 человека представляет собой:

```

      10      20      30      40      50
MGAARTLRL ALGLLLLLTI LRPADACSCS PVHPQQAFCN ADVVIRAKAV
      60      70      80      90     100
SEKEVDSGND IYGNPIKRIQ YEIKQIKMFK GPEKDIEFIY TAPSSAVCGV
     110     120     130     140     150
SLDVGGKKEY LIAGKAEGDG KMHITLCDFI VPWDTLSTTQ KKSILNHRVQM
     160     170     180     190     200
GCECKITRCP MIPCYISSPD ECLWMDWVTE KNINGHQAKF FACIKRSDGS
     210     220
CAWYRGAAPP KQEFLLDIEDP (SEQ ID NO:01)

```

В некоторых случаях целевая активность TIMP представляет собой активность TIMP1, т.е. активность, проявляемую белком TIMP1. Таким образом, под активностью TIMP1 подразумевается представляющая интерес активность белка TIMP1, т.е. активность, которая приводит к лечению ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше. Интерес представляют белки TIMP1 млекопитающего, такого как, без ограничения, следующие: примат, например человек, представитель собачьих, представитель кошачьих, представитель лошадиных, представитель бычьих, овца, мышь, представитель зайцеобразных и т.д. Последовательность TIMP1 человека представляет собой:

```

      10      20      30      40      50
MAPFEPLASG ILLLLLWLIAP SRACTCVPPH PQTAFCNSDL VIRAKFVGTP
      60      70      80      90     100
EVNQTTLYQR YEIKMTKMYK GFQALGDAAD IRFVYTPAME SVCGYFHRSH
     110     120     130     140     150
NRSEEFLLIAG KLQDGLLHIT TCSFVAPWNS LSLAQRGFT KTYTVGCEEC
     160     170     180     190     200
TVFPCLSI PC KLQSGTHCLW TDQLLQSGEK GFQSRHLACL PREPGLCTWQ
SLRSQIA (SEQ ID NO:02)

```

В некоторых случаях целевая активность TIMP представляет собой активность TIMP3, т.е. активность, проявляемую белком TIMP3. Таким образом, под активностью TIMP3 подразумевается представляющая интерес активность белка TIMP3, т.е. активность, которая приводит к лечению ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше. Интерес представляют белки TIMP3 млекопитающего, такого как, без ограничения, следующие: примат, например человек, представитель собачьих, представитель кошачьих, представитель лошадиных, представитель бычьих, овца, мышь, представитель зайцеобразных и т.д. Последовательность TIMP3 человека представляет собой:

```

      10      20      30      40      50
MTPWLGGLIVL LGSWSLGDWG AEACTCSPSH PQDAFCNSDI VIRAKVVGKK
      60      70      80      90     100
LVKEGPFPTL VYTIKQMKMY RGFTKMPHVQ YINTEASESL CGLKLEVNKY
      110     120     130     140     150
QYLLTGRVYD GKMYTGLCNF VERWDQLTSL QRKGLNYRYH LGCNCKIKSC
      160     170     180     190     200
YYLPCFVTSK NECLWTDMLS NFGYPGYQSK NYACIRQKGG YCSWYRGWAP
      210
PDKSIINATD P (SEQ ID NO:03)

```

В некоторых случаях целевая активность TIMP представляет собой активность TIMP4, т.е. активность, проявляемую белком TIMP4. Таким образом, под активностью TIMP3 подразумевается представляющая интерес активность белка TIMP4, т.е. активность, которая приводит к лечению ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше. Интерес представляют белки TIMP4 млекопитающего, такого как, без ограничения, следующие: примат, например человек, представитель собачьих, представитель кошачьих, представитель лошадиных, представитель бычьих, овца, мышь, представитель зайцеобразных и т.д. Последовательность TIMP4 человека представляет собой:

```

      10      20      30      40      50
MPGSPRPAPS WVLLRLRLAL LRPPGLGEAC SCAPANPQQH ICHSALVIRA
      60      70      80      90     100
KISSEKVVPA SADPADTEKM LRYEIKQIKM FKGFEKVKDV QYIYTPFDSS
      110     120     130     140     150
LCGVKLEANS QKQYLLTGQV LSDGKVFHIL CNYIEPWEDL SLVQRESLNH
      160     170     180     190     200
NYHLNCGCQI TTCYTVPCSTI SAPNECLWTD WLLERKLYGY QAQHYVCMKH
      210     220
VDGTCWYRG HPLRKEFVD IVQP (SEQ ID NO:04)

```

Представляющую интерес целевую активность или активности TIMP можно усилить с использованием любого удобного протокола. В некоторых случаях целевую активность TIMP усиливают путем увеличения системного содержания активного средства TIMP у млекопитающего. Под системным содержанием подразумевается содержание (например, концентрация или количество) активного средства TIMP в сердечно-сосудистой системе млекопитающего. Величина увеличения может варьировать, при этом в некоторых случаях величина увеличения является 2-кратной или больше, такой как 5-кратная или больше, включая в себя 10-кратную или больше, например 15-кратную или больше, 20-кратную или больше, 25-кратную или больше (по сравнению с подходящим контролем).

Согласно указанным вариантам осуществления системное содержание представляющего интерес активного средства TIMP можно увеличить с использованием любого удобного протокола. В некоторых случаях системное содержание увеличивают путем введения активного средства TIMP субъекту. В таких случаях активное средство TIMP может варьировать. Активные средства TIMP, которые можно использовать согласно указанным вариантам осуществления настоящего изобретения включают в себя полипептиды TIMP и нуклеиновые кислоты, кодирующие их.

Полипептиды TIMP представляют собой полипептиды, которые при введении субъекту, проявляют требуемую активность TIMP для лечения ассоциированного со старением состояния, например, как описано выше. Используемый в настоящем документе термин "полипептид" относится к полноразмерным белкам, а также их частям или фрагментам, которые проявляют требуемую активность TIMP. Кроме того, настоящим термином предусмотрены вариации встречающиеся в природе белки, при этом такие вариации являются гомологичными или по существу сходными с встречающимся в природе белком, как описано более подробно ниже, при этом встречающийся в природе белок представляет собой белок человека, белок мыши или белок из некоторых других видов, которые естественным образом экспрессируют белок TIMP. В последующем описании термин TIMP используют для обозначения не только человеческой формы белка TIMP, но также его гомологов, экспрессируемых в не являющихся человеком видах.

Представляющие интерес полипептиды TIMP могут варьировать в отношении длины аминокислотной последовательности и молекулярной массы. В некоторых случаях длина полипептидов TIMP находится в диапазоне от 175 до 350, например, от 200 до 250 и включая в себя от приблизительно 200 до 225 аминокислотных остатков, и характеризуются прогнозируемой молекулярной массой, основанной

исключительно на количестве аминокислотных остатков в белке, и принимая, что средняя молекулярная масса составляет 110 Да, что находится в диапазоне от 19 до 39 кДа, например 22-28 кДа, включая в себя 22-25 кДа, при этом фактическая молекулярная масса может варьировать в зависимости от уровня гликозилирования белка, а кажущаяся молекулярная масса может быть значительно меньше вследствие связывания SDS на гелях. Полипептиды TIMP, как описано в настоящем документе, можно получить из природных источников, например, с помощью техник очистки, химически синтезировать или получить с использованием рекомбинантных протоколов, при необходимости.

В некоторых случаях полипептид TIMP, который вводят субъекту, представляет собой белок TIMP2 человека, при этом белок TIMP2 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая содержит область, по существу такую же или идентичную последовательности, наблюдаемой как SEQ ID NO: 1. Под фразой "по существу такая же" подразумевается белок, характеризующийся областью с последовательностью, которая характеризуется 60% или больше, такой как 75% или больше, такой как 90% или больше идентичностью последовательности, и включает в себя 98% или больше идентичность последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, как определено с помощью BLAST с использованием установок по умолчанию. В некоторых случаях полипептид TIMP, который вводят субъекту, представляет собой белок TIMP1 человека, при этом белок TIMP1 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая содержит область, по существу такую же или идентичную последовательности, наблюдаемой как SEQ ID NO: 2. Под фразой "по существу такая же" подразумевается белок, характеризующийся областью с последовательностью, которая характеризуется 60% или больше, такой как 75% или больше, такой как 90% или больше идентичностью последовательности, и включает в себя 98% или больше идентичность последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, как определено с помощью BLAST с использованием установок по умолчанию. В некоторых случаях полипептид TIMP, который вводят субъекту, представляет собой белок TIMP3 человека, при этом белок TIMP3 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая содержит область, по существу такую же или идентичную последовательности, наблюдаемой как SEQ ID NO: 3. Под фразой "по существу такая же" подразумевается белок, характеризующийся областью с последовательностью, которая характеризуется 60% или больше, такой как 75% или больше, такой как 90% или больше идентичностью последовательности, и включает в себя 98% или больше идентичность последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 3, как определено с помощью BLAST с использованием установок по умолчанию. В некоторых случаях полипептид TIMP, который вводят субъекту, представляет собой белок TIMP4 человека, при этом белок TIMP4 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая содержит область, по существу такую же или идентичную последовательности, наблюдаемой как SEQ ID NO: 4. Под фразой "по существу такая же" подразумевается белок, характеризующийся областью с последовательностью, которая характеризуется 60% или больше, такой как 75% или больше, такой как 90% или больше идентичностью последовательности, и включает в себя 98% или больше идентичность последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 4, как определено с помощью BLAST с использованием установок по умолчанию.

В дополнение к конкретным белкам TIMP, описанным выше, гомологи или белки (или их фрагменты) от других видов, например других видов животных, также можно использовать согласно вариантам осуществления способов, при этом такие гомологи или белки могут происходить от множества различных типов видов, включая в себя животных, таких как млекопитающие, например грызуны, такие как мыши, крысы; домашние животные, например лошадь, корова, собака, кошка и т.д. Под гомологом подразумевается белок, характеризующийся 35% или больше, например, 40% и больше и 60% или больше идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к конкретным белкам TIMP, идентифицированным в SEQ ID NO: 01-04, при этом идентичность последовательности определяют с использованием BLAST при установках по умолчанию.

В дополнение к встречающимся в природе белкам TIMP, например, как описано выше, полипептиды TIMP, которые могут отличаться от встречающихся в природе белков TIMP, также можно использовать в осуществлении на практике способов согласно настоящему изобретению. Могут присутствовать различные вариации, включая в себя, без ограничения, мутации замены, вставки и/или делеции, а также другие типы не относящихся к аминокислотной последовательности вариаций, например, как проиллюстрировано ниже. Полипептиды TIMP, которые можно использовать, включают в себя белки, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, кодируемой открытой рамкой считывания (ORF) гена TIMP, включая в себя полноразмерный белок TIMP и его фрагменты, такие как биологически активные фрагменты и/или фрагменты, соответствующие функциональным доменам; и включая в себя слияния предусмотренных полипептидов с другими белками или их частями. Длина представляющих интерес фрагментов может варьировать, и в некоторых случаях она составляет 10 аа или больше, например, 50 аа или больше и включает в себя 100 аа или больше и в некоторых случаях не превышает 150 аа в длину, при этом данный фрагмент будет содержать участок аминокислот, который является по существу таким же или идентичным подпоследовательности, обнаруженной в любой из SEQ ID NO: 1-4; при этом подпоследовательность может варьировать в длину и в некоторых случаях составляет 10 аа или длиннее, например, 15 аа или длиннее, вплоть до 50 аа или даже длиннее.

В некоторых случаях полипептиды ТИМР используемые в способах согласно настоящему изобретению, включают в себя одну или несколько модификаций. Модификации, которые могут присутствовать, могут варьировать и включают в себя, без ограничения, замещения амидной связи, аминокислотные замены, включая в себя замены цистеиновых остатков/аналогов, образование цикла, пегилирование и т.д. Примеры модификаций, которые можно обнаружить в полипептидах ТИМР, используемых в способах согласно настоящему изобретению, рассмотрены более подробно ниже.

В некоторых случаях полипептиды ТИМР включают в себя одну или несколько связей, отличных от пептидных связей, например по меньшей мере две соседние аминокислоты соединены посредством связи, отличной от амидной связи. Например, для снижения или устранения ненужного протеолиза или другого способа разложения, и/или для увеличения стабильности в сыворотке, и/или ограничения или увеличения конформационной гибкости одну или несколько амидных связей в каркасе полипептида ТИМР можно подвергнуть замещению. В другом примере одну или несколько амидных связей (-CO-NH-) в полипептиде ТИМР можно заменить связью, которая представляет собой изоостеру амидной связи, такую как -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (цис и транс), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- или -CH₂SO-. Одну или несколько амидных связей в полипептиде ТИМР также можно заменить, например, восстановленной изоостерной псевдопептидной связью.

Одну или несколько аминокислотных замен можно осуществить в полипептиде ТИМР. Далее представлены неограничивающие примеры:

а) замена алкилзамещенных гидрофобных аминокислот, включая в себя аланин, лейцин, изолейцин, валин, норлейцин, (S)-2-аминомасляную кислоту, (S)-циклогексилаланин или другие простые альфа-аминокислоты, замещенные алифатической боковой цепью из C₁-C₁₀ атомов углерода, включая в себя разветвленные, циклические и неразветвленные алкильные, алкенильные или алкинильные замещения;

б) замена замещенных ароматической группой гидрофобных аминокислот, включая в себя фенилаланин, триптофан, тирозин, сульфотирозин, бифенилаланин, 1-нафтилаланин, 2-нафтилаланин, 2-бензотиенилаланин, 3-бензотиенилаланин, гистидин, включая в себя amino, алкиламино, диалкиламино, аза, галогенированные (фтор-, хлор-, бром- или йод-) или алкокси (C₁-C₄)замещенные формы вышеперечисленных ароматических аминокислот, иллюстративные примеры которых представляют собой следующее: 2-, 3- или 4-аминофенилаланин, 2-, 3- или 4-хлорфенилаланин, 2-, 3- или 4-метилфенилаланин, 2-, 3- или 4-метоксифенилаланин, 5-амино-, 5-хлор-, 5-метил- или 5-метокситриптофан, 2'-, 3'- или 4'-амино-, 2'-, 3'- или 4'-хлор-, 2-, 3- или 4-бифенилаланин, 2'-, 3'- или 4'-метил-, 2-, 3- или 4-бифенилаланин и 2- или 3-пиридилаланин;

в) замена аминокислот, содержащих основные боковые цепи, включая в себя аргинин, лизин, гистидин, орнитин, 2,3-диаминопропионовую кислоту, гомоаргинин, включая в себя алкил-, алкенил- или арилзамещенные (C₁-C₁₀ разветвленные, неразветвленные или циклические) производные приведенных выше аминокислот, независимо от того присутствует ли заместитель на гетероатомах (таких как альфа-азот или дистальный атом или атомы азота) или на альфа-атоме углерода, например, в положении про-R. Соединения, которые служат в качестве иллюстративных примеров, включают в себя следующее: N-эпсилон-изопропиллизин, 3-(4-тетрагидропиридил)глицин, 3-(4-тетрагидропиридил)аланин, N,N-гамма, гамма'-диэтилгомоаргинин. Также предусмотрены соединения, такие как альфа-метиларгинин, альфа-метил-2,3-диаминопропионовая кислота, альфа-метилгистидин, альфа-метилорнитин, в которых алкильная группа занимает про-R положение альфа-атома углерода. Кроме того, предусмотрены амиды, образованные из алкильных, ароматических, гетероароматических групп (где гетероароматическая группа содержит один или несколько атомов азота, кислорода или серы отдельно или в комбинации), карбоновых кислот или любого из многих хорошо известных активированных производных, таких как кислые хлориды, активные сложные эфиры, активные азолы и родственные производные, и лизин, орнитин или 2,3-диаминопропионовая кислота;

г) замена кислых аминокислот, включая в себя аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, гомоглутаминовую кислоту, тирозин, алкил-, арил-, арилалкил- и гетероарилсульфонамиды 2,4-диаминопропионовой кислоты, орнитин или лизин и тетразолзамещенные алкиламинокислоты;

е) замена амидных остатков боковой цепи, включая в себя аспарагин, глутамин и алкил- или ароматические замещенные производные аспарагина или глутамина; и

ф) замена гидроксилсодержащих аминокислот, включая в себя серин, треонин, гомосерин, 2,3-диаминопропионовую кислоту и алкил- или ароматические замещенные производные серина или треонина.

В некоторых случаях полипептид ТИМР включает в себя одну или несколько встречающихся в природе не генетически кодируемых L-аминокислот, синтетических L-аминокислот или D-энантиомеров аминокислоты. Например, полипептид ТИМР может включать в себя только D-аминокислоты. Например, полипептид ТИМР может включать в себя один или несколько следующих остатков: гидроксипролин, β-аланин, о-аминобензойная кислота, м-аминобензойная кислота, п-аминобензойная кислота, м-аминометилбензойная кислота, 2,3-диаминопропионовая кислота, α-аминоизомасляная кислота, N-метилглицин (саркозин), орнитин, цитруллин, т-бутилаланин, т-бутилглицин, N-метилизолейцин, фе-

нилглицин, циклогексилаланин, норлейцин, нафтилаланин, пиридилаланин 3-бензотиенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 2-фторфенилаланин, 3-фторфенилаланин, 4-фторфенилаланин, пеницилламин, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота, β -2-тиенилаланин, метионинсульфоксид, гомоаргинин, N-ацетиллизин, 2,4-диаминомасляная кислота, ρ -аминофенилаланин, N-метилвалин, гомоцистеин, гомосерин, ϵ -аминокапроновая кислота, ω -аминокапроновая кислота, ω -аминогептановая кислота, ω -аминокаприловая кислота, ω -аминокаприновая кислота, ω -аминотетрадекановая кислота, циклогексилаланин, α,γ -диаминомасляная кислота, α,β -диаминопропионовая кислота, δ -аминовалериановая кислота и 2,3-диаминомасляная кислота.

Остаток цистеина или аналог цистеина можно вводить в полипептид TIMP для обеспечения связи с другим пептидом посредством дисульфидной связи или для обеспечения образования цикла полипептида TIMP. Полипептид TIMP можно замыкать в цикл. Один или несколько цистеинов или аналогов цистеина можно вводить в полипептид TIMP, при этом введенный цистеин или аналог цистеина может образовывать дисульфидную связь со вторым введенным цистеином или аналогом цистеина. Другие средства образования цикла включают в себя введение оксимного линкера или лантионинового линкера; см., например, патент США № 8044175. Можно использовать и/или вводить любую комбинацию аминокислот (или неаминокислотных фрагментов), которые могут формировать образующую цикл связь. Образующую цикл связь можно создать с помощью любой комбинации аминокислот (или с помощью аминокислоты и $-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}$ или $-(\text{CH}_2)_n\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CO-}$) с функциональными группами, которые обеспечивают введение мостика. Некоторые примеры представляют собой дисульфиды, дисульфидные миметики, такие как $-(\text{CH}_2)_n\text{-карбамостик}$, тиоацеталь, тиоэфирные мостики (цистатионин или лантионин) и мостики, содержащие сложные эфиры и простые эфиры. В указанных примерах n может представлять собой любое целое число, но зачастую оно меньше десяти.

Другие модификации включают в себя, например, N-алкильную (или арильную) замену ($\psi[\text{CONR}]$) или поперечное сшивание каркаса для конструирования лактамов и других циклических структур. Другие производные включают в себя C-концевые гидроксиметильные производные, o-модифицированные производные (например, C-концевой гидроксиметилбензиловый простой эфир), модифицированные на N-конце производные, включая в себя замещенные амиды, такие как алкиламида и гидразиды.

Могут присутствовать модификации, которые обеспечивают улучшения одного или нескольких физических свойств полипептида TIMP. Улучшения физических свойств включают в себя, например, модуляцию иммуногенности; способы увеличения растворимости в воде, биодоступности, периода полужизни в сыворотке и/или терапевтического периода полужизни; и/или модуляцию биологической активности. Примеры таких модификаций включают в себя, без ограничения, пегилирование, гликозилирование (N- и O-сцепленное); полисиалилирование; молекулы слияния с альбумином, содержащие сывороточный альбумин (например, альбумин сыворотки человека (HSA), альбумин сыворотки яванского макака или альбумин бычьей сыворотки (BSA)); альбумин, связанный посредством, например, конъюгированной жирнокислотной цепи (ацилирование); и содержащие Fc белки слияния.

Пегилирование.

Клиническая эффективность белковых терапевтических средств может быть ограничена коротким периодом полужизни в плазме и предрасположенностью к разложению протеазами. Исследования различных терапевтических белков (например, филграстима) показали, что такие трудности можно преодолеть с помощью различных модификаций, включая в себя конъюгирование или связывание полипептидной последовательности с любым из разнообразных небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем или полиоксиполиэфирами. Это зачастую осуществляют с помощью соединяющего фрагмента, ковалентно связанного как с белком, так и небелковым полимером, например ПЭГ. Такие конъюгированные с ПЭГ биомолекулы, как было показано, обладают клинически применимыми свойствами, включая в себя лучшую физическую и термическую стабильность, защиту от подверженности ферментативному разложению, увеличенную растворимость, более продолжительный *in vivo* период полужизни в кровотоке и уменьшенный клиренс, сниженную иммуногенность и антигенность, а также сниженную токсичность. В дополнение к благоприятным эффектам пегилирования на фармакокинетические параметры пегилирование само по себе может усиливать активность. ПЭГ, подходящие для конъюгации с полипептидной последовательностью, являются, как правило, растворимыми в воде при комнатной температуре и характеризуются общей формулой $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{R}$, где R представляет собой водород или защитную группу, такую как группа алкила или алканола, и где n представляет собой целое число от 1 до 1000. Если R представляет собой защитную группу, она, как правило, содержит от 1 до 8 атомов углерода. Конъюгированная с ПЭГ полипептидная последовательность может являться неразветвленной или разветвленной. Разветвленные производные ПЭГ, "star-ПЭГ" и ПЭГ с многочисленными ветвлениями предусмотрены настоящим раскрытием. Молекулярная масса ПЭГ, используемого согласно настоящему раскрытию, не ограничена каким-либо конкретным диапазоном, и примеры приведены в других местах в настоящем документе; в качестве примера определенные варианты осуществления характеризуются молекулярными массами, составляющими 5-20 кДа, тогда как другие варианты осуществления характеризуются молекулярными массами, составляющими 4-10 кДа. Можно конъюги-

ровать пегелированные полипептиды ТИМР, причем ПЭГ характеризуются различными значениями n , и, таким образом, различные отличающиеся друг от друга ПЭГ присутствуют в конкретных соотношениях. Например, некоторые композиции содержат смесь конъюгатов, где $n=1, 2, 3$ и 4 . В некоторых композициях процентное отношение конъюгатов, где $n=1$, составляет 18-25%, процентное отношение конъюгатов, где $n=2$, составляет 50-66%, процентное отношение конъюгатов, где $n=3$, составляет 12-16%, и процентное отношение конъюгатов, где $n=4$, составляет вплоть до 5%. Такие композиции можно получить с помощью любых удобных условий реакции и очистки. Пегелирование чаще всего происходит на альфа-аминогруппе на N-конце полипептида, эpsilon-аминогруппе на боковой цепи остатков лизина и имидазольной группе на боковой цепи остатков гистидина. Поскольку большинство рекомбинантных полипептидов обладают одной альфа-аминогруппой и несколькими эpsilon-аминогруппами и имидазольными группами, многочисленные позиционные изомеры можно создать в зависимости от химического строения линкера. В настоящем документе можно применять общие стратегии пегелирования, такие как стратегии, известные в настоящей области техники. ПЭГ можно связать с полипептидом согласно настоящему раскрытию посредством концевой реакционноспособной группы ("спейсера"), который опосредует связь между свободной амино- или карбоксильной группами одной или нескольких полипептидных последовательностей и полиэтиленгликоля. ПЭГ, характеризующийся спейсером, который можно связать со свободной аминогруппой, включает в себя N-гидроксисукцинимидполиэтиленгликоль, который можно получить путем активации сложного эфира янтарной кислоты и полиэтиленгликоля с помощью N-гидроксисукцинимидом. Другой активированный полиэтиленгликоль, который можно связать со свободной аминогруппой, представляет собой 2,4-бис-(O-метоксиполиэтиленгликоль)-6-хлор-s-триазин, который можно получить путем реакции метилового эфира полиэтиленгликоля с хлоридом циануровой кислоты. Активированный полиэтиленгликоль, который можно связать со свободной карбоксильной группой, включает в себя полиоксиэтилендиамин. Конъюгацию одной или нескольких полипептидных последовательностей с ПЭГ, характеризующимся спейсером, можно провести с помощью различных общепринятых способов. Например, реакцию конъюгации можно провести в растворе при pH от 5 до 10, при температуре от 4°C до комнатной температуры, в течение от 30 мин до 20 ч, с использованием мольного отношения реагента к белку, составляющего от 4:1 до 30:1. Условия реакции можно выбрать для направления в сторону получения преимущественно требуемой степени замещения. Как правило, низкая температура, низкое значение pH (например, pH 5) и короткое время реакции имеют тенденцию к снижению количества прикрепленных ПЭГ, тогда как высокая температура, нейтральное-высокое значение pH (например, pH ≥ 7) и более продолжительное время реакции характеризуются тенденцией к увеличению числа прикрепленных ПЭГ. Различные средства, известные в настоящей области техники, можно использовать для остановки реакции. Согласно некоторым вариантам осуществления реакцию останавливают путем подкисления реакционной смеси и замораживания, например, при -20°C. Пегелирование различных молекул обсуждают, например, в патентах США № 5252714; 5643575; 5919455; 5932462 и 5985263. Согласно настоящему раскрытию также предусмотрено применение миметиков ПЭГ. Были разработаны рекомбинантные миметики ПЭГ, которые сохраняют признаки ПЭГ (например, повышенный период полужизни в сыворотке), при этом обеспечивая некоторые дополнительные благоприятные свойства. В качестве примера простые полипептидные цепи (содержащие, например, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser и Thr), способные образовывать растянутую конформацию, сходную с ПЭГ, можно получить рекомбинантно уже слитыми с пептидным или белковым лекарственным средством, представляющим интерес. Это устраняет необходимость в дополнительной стадии конъюгации во время производственного процесса. Более того, общепринятые техники молекулярной биологии позволяют контролировать состав боковых цепей полипептидных цепей, обеспечивая оптимизацию иммуногенности и технологические свойства.

Гликозилирование.

Для целей настоящего раскрытия подразумевается, что "гликозилирование" в широком смысле относится к ферментативному процессу, который прикрепляет гликаны к белкам, липидам или другим органическим молекулам. Подразумевается, что применение термина "гликозилирование" в отношении настоящего раскрытия, как правило, означает добавление или устранение одного или нескольких углеводных фрагментов (либо путем удаления основного сайта гликозилирования, либо путем устранения гликозилирования с помощью химических и/или ферментативных средств) и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые могут присутствовать или отсутствовать в нативной последовательности. Кроме того, фраза включает в себя качественные изменения в гликозилировании нативных белков, включая в себя изменение в природе и соотношениях различных присутствующих углеводных фрагментов. Гликозилирование может резко повлиять на физические свойства (например, растворимость) полипептидов, таких как полипептиды ТИМР, а также может являться важным в стабильности белков, их секреции и подклеточной локализации. Гликозилированные полипептиды также могут проявлять усиленную стабильность или могут улучшать одно или несколько фармакокинетических свойств, таких как период полужизни. Кроме того, улучшения растворимости, например, могут позволить создать составы, более подходящие для фармацевтического введения, чем составы, содержащие негликозилированный полипептид. Добавление сайтов гликозилирования можно осуществить путем из-

менения аминокислотной последовательности. Изменение в полипептиде можно осуществить, например, путем добавления или замены на один или несколько остатков серина или треонина (для сайтов O-сцепленного гликозилирования) или остатков аспарагина (для сайтов N-сцепленного гликозилирования). Структуры N-связанных и O-связанных олигосахаридов и остатки сахаров, встречающиеся в каждом типе, могут являться различными. Один тип сахара, который часто встречается на обоих типах олигосахаридов, представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту (в настоящем документе далее она носит название сиаловая кислота). Сиаловая кислота, как правило, представляет собой концевой остаток как N-связанных, так и O-связанных олигосахаридов и благодаря своему отрицательному заряду может придавать гликопротеину кислые свойства. Согласно конкретному варианту осуществления настоящего раскрытия предусмотрено создание и применение вариантов N-гликозилирования. Полипептидные последовательности согласно настоящему раскрытию можно необязательно изменить посредством изменений на уровне нуклеиновых кислот, в частности, путем мутирования нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, на предварительно выбранных основаниях так, чтобы создать кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты. Другой способ увеличения количества углеводных фрагментов на полипептиде состоит в химическом или ферментативном связывании гликозидов с полипептидом. Удаление углеводов можно осуществить химически или ферментативно или путем замены кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые являются гликозилированными. Известны техники химического дегликозилирования и ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептидах можно осуществить путем использования разнообразных эндо- и экзогликозидаз. Дефицитные по дигидрофолатредуктазе (DHFR) клетки яичника китайского хомячка (CHO) представляют собой широко используемую клетку-хозяина для получения рекомбинантных гликопротеинов. Указанные клетки не экспрессируют фермент бета-галактозид-альфа-2,6-сиалилтрансферазу и, следовательно, не добавляют сиаловую кислоту в альфа-2,6 связи к N-связанным олигосахаридам гликопротеинов, производимым в указанных клетках.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды являются гликозилированными естественным образом. Под "гликозилированный естественным образом" подразумевается, что полипептид характеризуется профилем гликозилирования, если он присутствует, который отличается от профиля гликозилирования, обнаруженного в соответствующем встречающемся в природе белке. Например, TIMP2 человека, используемый в способах согласно настоящему изобретению в соответствии с этим конкретным вариантом осуществления, характеризуется профилем гликозилирования, если он вообще гликозилирован, который отличается от характера гликозилирования встречающегося в природе TIMP2 человека. Таким образом, естественным образом гликозилированные полипептиды TIMP согласно настоящему варианту осуществления включают в себя негликозилированные полипептиды TIMP, т.е. белки, характеризующиеся отсутствием ковалентно связанных гликозильных групп.

Полисиалилирование.

Согласно настоящему раскрытию также предусмотрено применение полисиалилирования, конъюгации полипептидов с встречающейся в природе, биоразлагаемой α -(\rightarrow 8) связанной полисиаловой кислотой ("PSA") для улучшения стабильности полипептидов и их *in vivo* фармакокинетики. PSA представляет собой биоразлагаемый, нетоксический природный полимер, который является высокогидрофильным, что дает ему высокую кажущуюся молекулярную массу в крови, которая увеличивает его период полужизни в сыворотке. Кроме того, полисиалилирование ряда пептидных и белковых терапевтических средств привело к заметному снижению протеолизу, сохранению *in vivo* активности и снижению иммуногенности и антигенности (см., например, G. Gregoriadis et al., *Int. J. Pharmaceutics*, 300(1-2):125-30). Как и в случае модификаций с другими конъюгатами (например, ПЭГ), доступны различные техники для сайт-специфического полисиалилирования (см., например, T. Lindhout et al., (2011), *PNAS*, 108(18):7397-7402).

Слияние с альбумином.

Дополнительные подходящие компоненты и молекулы для конъюгации включают в себя альбумины, такие как альбумин сыворотки человека (HSA), альбумин сыворотки яванского макака или альбумин бычьей сыворотки (BSA). Зрелый HSA, 585-аминокислотный полипептид (~67 кДа), характеризующийся периодом полужизни в сыворотке, составляющим ~20 дней, в первую очередь отвечает за поддержание коллоидно-осмотического давления крови, pH крови, а также транспорт и распределение многочисленных эндогенных и экзогенных лигандов. Белок содержит три структурно гомологичных домена (домены I, II и III), практически полностью находится в альфа-спиральной конформации и в высокой степени стабилизирован 17 дисульфидными мостиками. Три основные области связывания с лекарственным средством альбумина расположены на каждом из трех доменов в пределах субдоменов IB, IIA и IIIA. Синтез альбумина происходит в печени, которая производит короткоживущий, первичный продукт препроальбумин. Таким образом, полноразмерный HSA содержит сигнальный пептид из 18 аминокислот (MKWVTFISLLFLFSSAYS; SEQ ID NO: 5), за которым следует продомен из 6 аминокислот (RGVFR; SEQ ID NO: 6); этот пептид из 24 аминокислотных остатков можно назвать препродоменом. HSA можно экспрессировать и секретировать с использованием его эндогенного сигнального пептида в качестве препродомена.

Альтернативно, HSA можно экспрессировать и секретировать с использованием сигнального пептида IgK, слитого со зрелым конструктором. Препроальбумин быстро котрансляционно расщепляется в просвете эндоплазматического ретикула на своем аминоконце с получением стабильного, 609-аминокислотного полипептида-предшественника, проальбумина. Затем проальбумин переходит в аппарат Гольджи, где он превращается в 585-аминокислотный зрелый альбумин с помощью зависимого от фурина аминоконцевого расщепления. Первичные аминокислотные последовательности, структура и функция альбуминов являются высококонсервативными между видами, как и процессы синтеза и секреции альбумина. Альбуминовые белки сыворотки, сопоставимые с HSA, обнаружены, например, у яванских макаков, коров, собак, кроликов и крыс. Из не относящихся к человеку видов альбумин бычьей сыворотки (BSA) является наиболее структурно сходным с HSA (см., например, Kosa et al., Nov 2007, J. Pharm. Sci. 96(11):3117-24). Согласно настоящему раскрытию предусмотрено применение альбумина из не относящегося к человеку вида, включая в себя, без ограничения, представленные выше виды, например, в способе разработки лекарственного средства. Согласно настоящему раскрытию альбумин можно конъюгировать с молекулой лекарственного средства (например, полипептидом, описанным в настоящем документе) на карбоксильном конце, аминоконце, как на карбоксильном, так и на аминоконцах и внутри молекулы (см., например, патенты США № 5876969 и 7056701). В конъюгатах HSA - TIMP, предусмотренных настоящим раскрытием, можно использовать различные формы альбумина, такие как последовательности секреции альбумина и их варианты, фрагменты и их варианты и варианты HSA. Такие формы обладают, как правило, одной или несколькими требуемыми активностями альбумина. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящее раскрытие предусматривает белки слияния, содержащие молекулу полипептидного лекарственного средства, слитую напрямую или опосредованно с альбумином, фрагментом альбумина и вариантом альбумина и т.д., причем белок слияния характеризуется более высокой стабильностью в плазме, чем не слитая молекула лекарственного средства и/или белок слияния сохраняет терапевтическую активность не слитой молекулы лекарственного средства. Согласно некоторым вариантам осуществления опосредованное слияние осуществляют с помощью линкера, такого как пептидный линкер или его модифицированная версия. Внутриклеточное расщепление можно проводить ферментативно, например, с помощью фурина или каспазы. Клетки экспрессируют низкое содержание указанных эндогенных ферментов, которые способны расщеплять часть молекулы слияния внутриклеточно; таким образом, некоторые из полипептидов секретируются из клетки, не будучи конъюгированными с HSA, при этом некоторые полипептиды секретируются в форме молекул слияния, которые содержат HSA. Согласно вариантам осуществления настоящего раскрытия предусмотрено применение различных конструкторов слияния с фурином. Например, можно разработать конструкторы, которые содержат последовательность RGRR, RKRKKR, RKKR или RRRKKR. Согласно настоящему раскрытию также предусмотрено внеклеточное расщепление (т.е. *ex vivo* расщепление), при котором молекулы слияния секретируются из клетки, подвергаются очистке и затем расщепляются. Следует понимать, что эксцизия может диссоциировать целый комплекс HSA-линкер от зрелого полипептида TEVIP или меньше, чем целый комплекс HSA-линкер. Как упоминалось выше, слияние альбумина с одним или несколькими полипептидами согласно настоящему раскрытию, например, можно осуществить с помощью генетической манипуляции так, чтобы нуклеиновая кислота, кодирующая HSA или его фрагмент, соединялась с нуклеиновой кислотой, кодирующей одну или несколько последовательностей полипептида. После этого подходящего хозяина можно трансформировать или трансфицировать слитыми нуклеотидными последовательностями в форме, например, подходящей плазмиды, с тем, чтобы экспрессировать полипептид слияния. Экспрессию можно осуществить *in vitro*, например, из прокариотических или эукариотических клеток или *in vivo*, например, из трансгенного организма. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия экспрессию белка слияния проводят в клеточных линиях млекопитающего, например клеточных линиях CHO. Трансформацию в настоящем документе используют в широком смысле для обозначения генетического изменения клетки в результате прямого поглощения через клеточную мембрану, встраивания и экспрессии экзогенного генетического материала (экзогенной нуклеиновой кислоты). Трансформация происходит естественным образом в некоторых видах бактерий, но ее можно осуществить с помощью искусственных средств в других клетках. Более того, альбумин сам по себе можно модифицировать для увеличения его периода полужизни в кровотоке. Слияние модифицированного альбумина с полипептидом TIMP можно осуществить с помощью техник генетической манипуляции, описанных выше, или с помощью химической конъюгации; полученная молекула слияния характеризуется периодом полужизни, который превышает период полужизни слияний с немодифицированным альбумином. Представляющие интерес белки слияния TIMP2-альбумин включают в себя описанные в патенте США № 7163805, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Несколько стратегий связывания с альбумином были разработаны в качестве альтернатив прямому слиянию, включая в себя связывание с альбумином посредством конъюгированной жирнокислотной цепи (ацилирование). Поскольку альбумин сыворотки представляет собой транспортный белок для жирных кислот, указанные природные лиганды с альбумин-связывающей активностью использовали для увеличения продолжительности периода полужизни небольших белковых терапевтических средств. Например,

инсулин детермир (Левемир (LEVEMIR)), одобренный продукт при сахарном диабете, содержит миристиловую цепь, конъюгированную с генетически модифицированным инсулином, давая в результате аналог инсулина длительного действия. Согласно настоящему раскрытию также предусмотрены белки слияния, которые содержат полипептидную последовательность альбумин-связывающего домена (ABD) и последовательность одного или нескольких полипептидов, описанных в настоящем документе. Любая полипептидная последовательность ABD, описанная в литературе, может являться компонентом белков слияния. Компоненты белков слияния можно необязательно ковалентно связать посредством линкера, такого как те линкеры, которые описаны в настоящем документе. Согласно некоторым из вариантов осуществления настоящего раскрытия белки слияния содержат полипептидную последовательность ABD в виде N-концевого фрагмента и полипептиды, описанные в настоящем документе, в виде C-концевого фрагмента. Согласно настоящему раскрытию также предусмотрены белки слияния, содержащие фрагмент альбумин-связывающего полипептида, при этом этот фрагмент по существу сохраняет связывание с альбумином; или мультимер альбумин-связывающих полипептидов или их фрагменты, содержащие по меньшей мере два альбумин-связывающих полипептида или их фрагменты в виде мономерных звеньев.

Конъюгация с другими молекулами.

Дополнительные подходящие компоненты и молекулы для конъюгации включают в себя, например, следующее: тироглобулин; столбнячный анатоксин; дифтерийный анатоксин; полиаминокислоты, такие как поли(D-лизин:D-глутаминовая кислота); полипептиды VP6 ротавирусов; гемагглютинин вируса гриппа, нуклеопротеин вируса гриппа; гемоцианин фисуреллы (KLH); и капсидный белок и поверхностный антиген вируса гепатита В или любая их комбинация. Таким образом, согласно настоящему раскрытию предусмотрена конъюгация одного или нескольких дополнительных компонентов или молекул на N- и/или C-конце полипептидной последовательности, такой как другой полипептид (например, полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, гетерологичной предусмотренному полипептиду) или молекула-носитель. Таким образом, иллюстративную полипептидную последовательность можно предусмотреть в виде конъюгата с другим компонентом или молекулой. Модификация конъюгата может давать в результате полипептидную последовательность, которая сохраняет активность с дополнительной или комплементарной функцией или активностью, обусловленной второй молекулой. Например, полипептидную последовательность можно конъюгировать с молекулой, например, для облегчения растворимости, хранения, *in vivo* периода полужизни или стабильности или периода полужизни или стабильности при хранении, снижения иммуногенности, отсроченного или контролируемого высвобождения *in vivo* и т.д. Другие функции или активности включают в себя конъюгат, который снижает токсичность по отношению к неконъюгированной полипептидной последовательности, конъюгат, который нацеленно воздействует на тип клетки или орган более эффективно, чем неконъюгированная полипептидная последовательность, или лекарственное средство для дальнейшего противодействия причинам или эффектам, ассоциированным с заболеванием, нарушением или состоянием, перечисленным в настоящем документе (например, злокачественная опухоль). Полипептид TMP также можно конъюгировать с большими, медленно метаболизируемыми макромолекулами, такими как белки; полисахариды, такие как сефароза, агароза, целлюлоза или целлюлозные гранулы; полимерные аминокислоты, такие как полиглутаминовая кислота или полилизин; аминокислотные сополимеры; инактивированные вирусные частицы; инактивированные бактериальные токсины, такие как анатоксин дифтерии, столбняка, холеры, или молекулы лейкотоксина; инактивированные бактерии и дендритные клетки. Такие конъюгированные формы при необходимости можно использовать для получения антител к полипептиду согласно настоящему раскрытию. Дополнительные кандидатные компоненты и молекулы для конъюгации включают в себя те, которые являются подходящими для выделения или очистки. Конкретные неограничивающие примеры включают в себя связывающие молекулы, такие как биотин (специфическая связывающая пара биотин-авидин), антитело, рецептор, лиганд, лектин или молекулы, которые содержат твердую подложку, включая в себя, например, пластиковые или полистирольные гранулы, планшеты или гранулы, магнитные гранулы, тест-полоски и мембраны. Способы очистки, такие как катионообменная хроматография, можно использовать для разделения конъюгатов за счет разницы зарядов, которые эффективно разделяют конъюгаты по их различным молекулярным массам. Например, катионообменную колонку можно нагрузить и затем отмыть с помощью ~20 mM ацетата натрия, pH ~4 и затем элюировать с помощью линейного (0-0,5 M) градиента NaCl, забуференного при pH от приблизительно 3 до 5,5, например, при pH ~4,5. Содержание фракций, полученных с помощью катионообменной хроматографии, можно идентифицировать по молекулярной массе с использованием общепринятых способов, например масс-спектрометрии, SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) или других известных способов разделения молекул по молекулярной массе.

Молекулы слияния с Fc-областью.

Согласно определенным вариантам осуществления amino- или карбоксильный конец полипептидной последовательности согласно настоящему раскрытию можно слить с Fc-областью иммуноглобулина (например, Fc человека) с образованием конъюгата слияния (или молекулы слияния). Конъюгаты слияния с Fc-областью, как было показано, увеличивают системный период полужизни биофармацевтических средств, и, таким образом, биофармацевтический продукт может требовать менее частого введения. Fc

связывается с неонатальным рецептором Fc (FcRn) в эндотелиальных клетках, которые выстилают кровеносные сосуды, и при связывании молекула слияния с Fc-областью защищена от разложения и повторно высвобождается в кровоток, дольше сохраняя молекулу в кровотоке. Полагают, что связывание Fc является механизмом, за счет которого эндогенный IgG сохраняет свой продолжительный период полужизни в плазме. Более современная технология Fc-слияния связывает единственную копию биофармацевтического средства с Fc-областью антитела для оптимизации фармакокинетических и фармакодинамических свойств биофармацевтического средства по сравнению с традиционными конъюгатами слияния с Fc-областью.

Другие модификации.

Согласно настоящему раскрытию предусмотрено применение других модификаций, известных в настоящее время или разработанных в будущем, в отношении полипептидов TIMP для улучшения одного или нескольких свойств. Один такой способ пролонгирования периода полужизни в кровотоке, увеличения стабильности, снижения клиренса или изменения иммуногенности или аллергенности полипептида согласно настоящему раскрытию включает в себя модификацию полипептидных последовательностей путем присоединения ГЭГ, при котором используют производные гидроксизилкрахмала, связанные с другими молекулами, для модификации характеристик полипептидных последовательностей.

Линкеры.

Линкеры и их использование было описано выше. Любой из вышеперечисленных компонентов и молекул, используемых для модификации полипептидных последовательностей согласно настоящему раскрытию, можно необязательно конъюгировать посредством линкера. Подходящие линкеры включают в себя "гибкие линкеры", которые, как правило, характеризуются достаточной длиной для обеспечения некоторого движения между модифицированными полипептидными последовательностями и связанными компонентами и молекулами. Молекулы-линкеры, как правило, составляют приблизительно 6-50 атомов в длину. Молекулы-линкеры также могут представлять собой, например, олигомеры арилацетилена, этиленгликоля, содержащие 2-10 мономерных звеньев, диамины, дикарбоновые кислоты, аминокислоты или их комбинации. Подходящие линкеры можно легко выбрать, и они могут характеризоваться любой подходящей длиной, такой как 1 аминокислота (например, Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 или больше чем 50 аминокислот. Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (например, (GS)_n, GSGGS_n, GGGS_n, (G_mS_o)_n, (G_mS_oG_m)_n, (G_mS_oG_mS_oG_m)_n, (GSGGS_m)_n, (GSGS_mG)_n и (GGGS_m)_n и их комбинации, где m и o, каждый независимо, выбраны из целого числа, составляющего по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтрального соединения между компонентами. Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя, без ограничения, GGSG, GGSGG, GSGSG, GSGGG, GGGSG и GSSSG.

В некоторых случаях системное содержание полипептида TIMP увеличивают путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность, субъекту при условиях, достаточных для экспрессии кодирующей последовательности в организме субъекта. В зависимости от требуемого полипептида TIMP нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность, может варьировать. Представляющие интерес нуклеиновые кислоты включают в себя нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды TIMP, приведенные выше. Конкретные представляющие интерес нуклеиновые кислоты включают в себя, без ограничения, TIMP2 человека (аннотированная последовательность NCBI: NM_003255.4); TIMP1 человека (аннотированная последовательность NCBI: NM_003254.2); TIMP3 человека (аннотированная последовательность NCBI: NM_000362.4) и TIMP4 человека (аннотированная последовательность NCBI: NM_003256.3).

Под нуклеиново-кислотной композицией подразумевается композиция, содержащая последовательность ДНК, характеризующуюся открытой рамкой считывания, которая кодирует представляющий интерес полипептид TIMP, т.е. кодирующая TIMP последовательность, и способную при соответствующих условиях экспрессироваться в виде полипептида TIMP. Кроме того, под этим термином подразумеваются нуклеиновые кислоты, которые являются гомологичными, по существу сходными или идентичными конкретным нуклеиновым кислотам, описанным выше. В дополнение к описанным выше конкретным нуклеиново-кислотным композициям, также интерес представляют гомологи описанных выше последовательностей. Согласно определенным вариантам осуществления сходство последовательностей между гомологами составляет 20% или выше, например, 25% или выше и включает в себя 30, 35, 40, 50, 60, 70% или выше, включая в себя 75, 80, 85, 90% и 95% или выше. Сходство последовательностей рассчитывают на основании эталонной последовательности, которая может представлять собой разновидность большей последовательности, такую как консервативный мотив, кодирующая область, фланкирующая область и т.д. Эталонная последовательность может составлять 18 нуклеотидов в длину или длиннее, например 30 нуклеотидов в длину, и может продолжаться до полной последовательности, которая подлежит сравнению. Алгоритмы для анализа последовательности известны в настоящей области техники, такие как BLAST, описанный в Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10 (с использованием установок по умолчанию, т.е. параметры w=4 и T=17). Особый интерес согласно определенным вариан-

там осуществления представляют нуклеиновые кислоты по существу такой же длины, как и конкретные нуклеиновые кислоты TIMP1 - TIMP4 человека, упомянутые выше, где под "по существу такой же длины" подразумевается, что любое различие в длине не превышает приблизительно 20%, как правило, не превышает приблизительно 10% и чаще не превышает приблизительно 5%; и характеризуется идентичностью последовательности по отношению к любой из указанных последовательностей, составляющей 90% или больше, такой как 95% или больше, и включает в себя 99% или больше по всей длине нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты характеризуются последовательностью, которая по существу является сходной или идентичной приведенным выше конкретным последовательностям. Под "по существу сходная" подразумевается, что идентичность последовательности составляет 60% или больше, например, 75% или больше и включает в себя 80, 85, 90 или даже 95% или больше. Представляющие интерес нуклеиновые кислоты также включают в себя нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, кодируемые вышеописанными нуклеиновыми кислотами, но их последовательность отличается от вышеописанных нуклеиновых кислот вследствие вырожденности генетического кода.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в векторе. Различные векторы (например, вирусные векторы, бактериальные векторы или векторы, способные к репликации в эукариотических и прокариотических хозяевах) можно использовать согласно настоящему изобретению. Многочисленные векторы, которые могут реплицироваться в эукариотических и прокариотических хозяевах, известны в настоящей области техники и являются коммерчески доступными. В некоторых случаях такие векторы, используемые согласно настоящему изобретению, состоят из бактериальной точки начала репликации и эукариотического промотора, функционально связанного с представляющей интерес ДНК.

Вирусные векторы, используемые согласно настоящему изобретению, могут состоять из вирусной частицы, происходящей из встречающегося в природе вируса, который был генетически изменен, чтобы стать дефектным в отношении вирусной репликации и экспрессировать представляющий интерес рекомбинантный ген согласно настоящему изобретению. Как только вирус доставляет свой генетический материал в клетку, он не создает дополнительный инфекционный вирус, а вводит в клетку экзогенные рекомбинантные гены, предпочтительно в геном клетки. Многочисленные вирусные векторы хорошо известны в настоящей области техники, включая в себя, например, векторы на основе ретровируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса, вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса осповакцины и полиовируса.

Представляющую интерес ДНК можно вводить с использованием невирусного вектора, например, в виде состава ДНК- или РНК-липосомного комплекса. Такие комплексы содержат смесь липидов, которые связываются с генетическим материалом (ДНК или РНК), обеспечивая гидрофобную оболочку, которая позволяет доставить генетический материал в клетки. Липосомы, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, включают в себя DOPE (диолеилфосфатидилэтаноламин), CUDMEDA(N-(5-холеструм-3-бета.-ол-3-уретанил)-N',N'-диметилэтилендиамин). Если представляющую интерес ДНК вводят с использованием липосомы, в некоторых случаях сначала определяют *in vitro* оптимальные значения для отношений ДНК: липида и абсолютные концентрации ДНК и липида в зависимости от гибели клеток и эффективности трансформации для конкретного типа клетки, подлежащей трансформации. Указанные значения затем можно использовать или экстраполировать для использования в *in vivo* трансформации. *In vitro* определения указанных значений можно легко провести с использованием техник, которые хорошо известны в настоящей области техники.

Другие невирусные векторы также можно использовать согласно настоящему изобретению. Они включают в себя химические составы ДНК или РНК, соединенных с молекулой-носителем (например, антитело или лиганд рецептора), которая облегчает доставку к клеткам-хозяевам с целью изменения биологических свойств клеток-хозяев. Под термином "химические составы" подразумеваются модификации нуклеиновых кислот для обеспечения связывания нуклеиново-кислотных соединений с молекулой-носителем, такой как белок, или липид, или их производное. Иллюстративные белковые молекулы-носители включают в себя антитела, специфические по отношению к клеткам целевой секреторной железы, или лиганды рецепторов, т.е. молекулы, способные взаимодействовать с рецепторами, ассоциированными с клеткой целевой секреторной железы.

Конструкты ДНК могут включать в себя промотор для облегчения экспрессии представляющей интерес ДНК внутри целевой клетки, такой как сильный, эукариотический промотор. Иллюстративные эукариотические промоторы включают в себя промоторы из цитомегаловируса (CMV), вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса саркомы Рауса (RSV) и аденовируса. Более конкретно, иллюстративные промоторы включают в себя промотор из немедленного раннего гена CMV человека (Boshart et al., Cell, 41:521-530, 1985) и промотор из длинного концевой повтора (LTR) RSV (Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6777-6781, 1982).

Вместо введения полипептида TIMP, например, как описано выше, системное содержание активного средства TIMP у субъекта можно усилить путем стимуляции эндогенной продукции и/или высвобождения полипептида TIMP *in vivo*.

Кроме того, интерес представляют потенцирующие активность ТИМР средства. Под потенцирующим ТИМР средством подразумевается средство или комбинация средств, которые действуют для увеличения требуемой активности ТИМР эндогенных полипептидов ТИМР, присутствующих в организме субъекта, подлежащего лечению. Величина увеличения может варьировать, при этом в некоторых случаях величина увеличения является 2-кратной или больше, например, 5-кратной или больше, включая в себя 10-кратную или больше, например, 15-кратную или больше, 20-кратную или больше, 25-кратную или больше (по сравнению с подходящим контролем). Представляющие интерес потенцирующие ТИМР средства могут действовать посредством разнообразия различных механизмов, например путем усиления связывающего взаимодействия между полипептидом ТИМР и требуемой мишенью; путем увеличения биодоступности эндогенного пула, например, путем секвестрации нежелательных мишеней конкурентного связывания и т.д.

Согласно другим вариантам осуществления средство представляет собой низкомолекулярное средство, которое проявляет требуемую активность ТИМР. Представляющие интерес встречающиеся в природе или синтетические низкомолекулярные соединения включают в себя многочисленные химические классы, такие как органические молекулы, например низкомолекулярные органические соединения, характеризующиеся молекулярной массой, составляющей больше чем 50 и меньше чем приблизительно 2500 Да. Кандидатные средства содержат функциональные группы для структурного взаимодействия с белками, в частности образования водородных связей, и, как правило, включают в себя по меньшей мере группу амина, карбонила, гидроксила или карбоксила, предпочтительно по меньшей мере две из функциональных химических групп. Кандидатные средства могут включать в себя циклически углеродные или гетероциклические структуры и/или ароматические или полиароматические структуры, замещенные одной или несколькими из вышеперечисленных функциональных групп. Кандидатные средства также встречаются среди биомолекул, включая в себя пептиды, сахараиды, жирные кислоты, стероиды, пурины, пиримидины, их производные, структурные аналоги или комбинации. Такие молекулы можно идентифицировать, среди прочих способов, путем использования описанных ниже протоколов скрининга.

При осуществлении на практике способов согласно настоящему изобретению активное(ые) средство(а) можно вводить взрослому млекопитающему с использованием любого удобного протокола введения, который способен привести к требуемой активности. Таким образом, средство можно ввести в разнообразные составы, например фармацевтически приемлемые несущие среды для терапевтического введения. Более конкретно, средства согласно настоящему изобретению можно составить в фармацевтических композициях путем комбинации с подходящими, фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и можно составить в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, такие как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази (например, кремы для кожи), растворы, суппозитории, инъекции, средства для ингаляции и аэрозоли. Таким образом, введение средств можно осуществить различными путями, включая в себя пероральное, буккальное, ректальное, парентеральное, интраперитонеальное, интрадермальное, трансдермальное, интратрахеальное и т.д. введение.

В фармацевтических лекарственных формах средства можно вводить в форме их фармацевтически приемлемых солей или их также можно использовать отдельно или в соответствующей ассоциации, а также в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Следующие способы и вспомогательные вещества являются исключительно иллюстративными и ни в коем случае не являются ограничивающими.

Для пероральных препаратов средства можно использовать отдельно или в комбинации с соответствующими добавками для получения таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с помощью общепринятых добавок, таких как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; с помощью связующих, таких как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с помощью разрыхлителей, таких как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или натрийкарбоксиметилцеллюлоза; с помощью смазывающих средств, таких как тальк или стеарат магния; и при необходимости с помощью разбавителей, буферных средств, увлажняющих средства, консервантов и вкусоароматических средств.

Средства можно составить в препараты для инъекции путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие сходные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и при необходимости с помощью общепринятых добавок, таких как солюбилизаторы, изотонические средства, суспендирующие средства, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

Средства можно использовать в составе аэрозоля, подлежащего введению посредством ингаляции. Соединения согласно настоящему изобретению можно составить в находящихся под давлением приемлемых пропеллентах, таких как дихлордифторметан, пропан, азот и подобное.

Более того, средства можно составить в суппозитории путем смешивания с разнообразными основами, такими как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить ректально посредством суппозитория. Суппозиторий может включать в себя несущие среды, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, оставаясь в твердом состоянии при комнатной температуре.

Для перорального или ректального введения можно предусмотреть единичные лекарственные формы, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, причем каждая единица дозирования, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит заданное количество композиции, содержащей один или несколько ингибиторов. Аналогично единичные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать ингибитор(ы) в композиции в виде раствора в стерильной воде, изотоническом растворе хлорида натрия или другом фармацевтически приемлемом носителе.

Используемый в настоящем документе термин "единичная лекарственная форма" относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов-людей и животных, причем каждая единица содержит заданное количество соединений согласно настоящему изобретению, рассчитанное в количестве, достаточном для обеспечения требуемого эффекта в ассоциации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или несущей средой. Технические характеристики для новых единичных лекарственных форм согласно настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения и эффекта, который должен быть достигнут, а также фармакодинамики, связанной с каждым соединением в организме хозяина.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как несущие среды, адъюванты, носители или разбавители, являются общедоступными. Более того, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как регулирующие pH и буферные средства, регулирующие тоничность средства, стабилизаторы, смачивающие средства и подобное, являются общедоступными.

Если средство представляет собой полипептид, полинуклеотид, их аналог или миметик, его можно ввести в ткани или клетки-хозяева с помощью любого числа путей, включая в себя инфицирование вирусом, микроинъекцию или слияние везикул. Безыгольное впрыскивание также можно использовать для внутримышечного введения, как описано Furth et al., *Anal Biochem.* (1992), 205:365-368. ДНК можно нанести на золотые микрочастицы и доставить интрадермально с помощью устройства для бомбардировки частицами, или "генной пушки", как описано в литературе (см., например, Tang et al., *Nature* (1992), 356:152-154), где на золотые микрочастицы наносят ДНК, а затем ими бомбардируют клетки кожи. Для нуклеиново-кислотных терапевтических средств находят применения ряд различных носителей для доставки, включая в себя вирусные и невирусные векторные системы, которые известны в настоящей области техники.

Специалистам в настоящей области техники понятно, что уровни дозы могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, природы носителя для доставки и подобного. Предпочтительные дозировки для данного соединения легко определяют специалисты в настоящей области техники с помощью разнообразных средств.

Согласно тем вариантам осуществления, в которых эффективное количество активного средства вводят взрослому млекопитающему, количество или дозировка является эффективной при введении в течение подходящего периода времени, такого как 1 неделя или дольше, включая в себя 2 недели или дольше, например, 3 недели или дольше, 4 недели или дольше, 8 недель или дольше и т.д., с тем, чтобы продемонстрировать снижение нарушения, например снижение когнитивных способностей и/или улучшение когнитивных способностей у взрослого млекопитающего. Например, эффективная доза представляет собой дозу, которая при введении в течение подходящего периода времени, такого как по меньшей мере приблизительно 1 неделя и, возможно, приблизительно 2 недели или больше, вплоть до периода, составляющего приблизительно 3 недели, 4 недели, 8 недель или дольше, будет замедлять, например, на приблизительно 20% или больше, например, на 30% или больше, на 40% или больше или на 50% или больше, в некоторых случаях на 60% или больше, на 70% или больше, на 80% или больше или на 90% или больше, например, будет останавливать снижение когнитивных способностей у пациента, страдающего от естественного старения или ассоциированного со старением нарушения. В некоторых случаях эффективное количество или доза активного средства будет не только замедлять или останавливать прогрессирование болезненного состояния, но будет также индуцировать обратное развитие состояния, т.е. будет вызывать улучшение когнитивной способности. Например, в некоторых случаях эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в течение подходящего периода времени, как правило, по меньшей мере приблизительно 1 неделю и, возможно, приблизительно 2 недели или больше, вплоть до периода, составляющего приблизительно 3 недели, 4 недели, 8 недель или дольше, будет улучшать когнитивные способности индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением когнитивного нарушения, например, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, в некоторых случаях в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или больше относительно познавательной способности перед введением препарата крови.

При необходимости эффективность лечения можно оценить с использованием любого удобного протокола. Тестирование когнитивной деятельности и тестирование IQ (коэффициент интеллекта) для измерения когнитивной способности, например, следующее: внимание и концентрация, способность обучаться сложным задачам и понятиям, память, обработка информации, функция пространственного зрения, способность порождать речь и понимать ее, способность решать проблемы и принимать решения, а также способность осуществлять исполнительные функции, хорошо известны в настоящей области техники, любое из указанного можно использовать для измерения когнитивной способности индивидуу-

ма до и/или во время и после лечения с помощью предусмотренного препарата крови, например, для подтверждения того, что было введено эффективное количество. Они включают в себя, например, следующее: тест оценки общей познавательной способности (GPCOG), скрининг нарушения памяти, краткая шкала оценки психического статуса (MMSE), Калифорнийский тест вербального научения, второе издание, краткая форма, для оценки памяти, система оценки исполнительного функционирования Delis-Kaplan, шкала оценки болезни Альцгеймера (ADAS-Cog), психогериатрическая шкала оценки (PAS) и подобное. Прогрессирование функциональных улучшений головного мозга можно обнаружить с помощью техник получения изображений головного мозга, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) или позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и подобное. Широкий спектр дополнительных функциональных оценок можно применить для мониторинга повседневной активности, исполнительных функций, двигательной функции и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает стадию измерения когнитивной способности и обнаружения пониженной скорости снижения когнитивных способностей, стабилизации когнитивной способности и/или увеличения когнитивной способности после введения препарата крови по сравнению с когнитивной способностью индивидуума до введения препарата крови. Такие измерения можно осуществить через 1 неделю или больше после введения препарата крови, например через 1 неделю, 2 недели, 3 недели или больше, например, 4 недели, 6 недель или 8 недель или больше, например, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или больше.

Биохимически под "эффективным количеством" или "эффективной дозой" активного средства подразумевается количество активного средства, которое будет ингибировать, противодействовать, уменьшать, снижать или подавлять приблизительно на 20% или больше, например, на 30% или больше, на 40% или больше или на 50% или больше, в некоторых случаях на 60% или больше, на 70% или больше, на 80% или больше или на 90% или больше, в некоторых случаях приблизительно на 100%, т.е. до пренебрежимо малых количеств, и в некоторых случаях вызывать обратное развитие сокращения синаптической пластичности и потери синапсов, которые происходят во время процесса естественного старения или во время прогрессирования ассоциированного со старением расстройства. Иными словами, клетки, присутствующие в организме взрослых млекопитающих, подлежащих лечению согласно способам настоящего изобретения, становятся более восприимчивыми к стимулам, например стимулам активности, которые стимулируют формирование и поддержание синапсов.

Результативность способов согласно настоящему изобретению, например, как описано выше, может проявляться в виде улучшений в наблюдаемой синаптической пластичности как *in vitro*, так и *in vivo* в виде индукции долговременной потенциации. Например, индукцию LTP в нейронных контурах можно наблюдать у бодрствующих индивидуумов, например, путем проведения неинвазивных техник стимуляции на бодрствующих индивидуумах для индукции LTP-подобных продолжительных изменений в локализованной нейронной активности (Cooke S.F., Bliss TV (2006), *Plasticity in the human central nervous system. Brain.* 129(Pt 7):1659-73); картирования пластичности и увеличенной активности нейронных сетей у индивидуумов, например, с использованием позитронно-эмиссионной томографии, функциональной магнитно-резонансной томографии и/или транскраниальной магнитной стимуляции (Cramer and Bastings, "Mapping clinically relevant plasticity after stroke", *Neuropharmacology*, (2000), 39:842-51); и путем обнаружения нейронной пластичности после обучения, т.е. улучшений памяти, например, путем оценки связанной с извлечением информации активности головного мозга (Buchmann et al., "Prion protein M129V polymorphism affects retrieval-related brain activity", *Neuropsychologia* (2008), 46:2389-402) или, например, путем получения изображений ткани головного мозга с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) после повторения фиксирования установки с помощью знакомых и незнакомых объектов (Soldan et al., "Global familiarity of visual stimuli affects repetition-related neural plasticity but not repetition priming", *Neuroimage* (2008), 39:515-26; Soldan et al., "Aging does not affect brain patterns of repetition effects associated with perceptual priming of novel objects", *J. Cogn. Neurosci.* (2008), 20:1762-76). Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает стадию измерения синаптической пластичности и обнаружение пониженной скорости потери синаптической пластичности, стабилизации синаптической пластичности и/или увеличения синаптической пластичности после введения препарата крови по сравнению с синаптической пластичностью индивидуума до введения препарата крови. Такие измерения можно осуществить через 1 неделю или больше после введения препарата крови, например, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели или больше, например, через 4 недели, 6 недель или 8 недель или больше, например, через 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или больше.

В некоторых случаях способы приводят к изменению уровней экспрессии одного или нескольких генов в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (как описано в экспериментальном разделе ниже). Изменение уровня экспрессии данного гена может являться 0,5-кратным или больше, например, 1,0-кратным или больше, включая в себя 1,5-кратное или больше. Ткань может быть различной и в некоторых случаях представляет собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая в себя ткань головного мозга, например гиппокампальную ткань. В некоторых случаях модуляция гиппокампальной экспрессии гена проявляется в виде усиленной гиппокампальной пластичности, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях один или несколько генов, чью экспрессию модулируют, например усиливают, представ-

ляет собой ген, кодирующий продукт, который представляет собой представителя сигнального пути, связанного с пластичностью (т.е. ген регуляции синаптической пластичности), например, *Tlr4*, *Gria1*, *Kcnj10*, *Kdr*, *Ncam*, *Sdfr1*, *Egr1*, белки *Fos*, например, *c-Fos*, *Drd1a*, *Stxbp1*, *Mef2c*, *Cntn2*, *Junb*, *Bdnf* и *CamK2a* и т.д. В некоторых случаях модуляция гиппокампальной экспрессии гена проявляется в виде усиленной гиппокампальной пластичности, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях один или несколько генов, чью экспрессию модулируют, например усиливают, представляет собой ген, кодирующий продукт, который представляет собой представителя сети, связанной с синаптической пластичностью и обучением, а также памятью, например, без ограничения, *RELN*, *NTRK3*, *ERNA4* и т.д.

В некоторых случаях лечение приводит к усилению содержания одного или нескольких белков в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (как описано в экспериментальном разделе ниже). Изменение содержания белка данного белка может являться 0,5-кратным или больше, таким как 1,0-кратное или больше, включая в себя 1,5-кратное или больше, при этом в некоторых случаях можно достичь содержания, которое соответствует здорового содержания дикого типа, например, в пределах 50% или меньше, такое как 25% или меньше, включая в себя 10% или меньше, например, 5% или меньше здорового содержания дикого типа. Ткань может быть различной и в некоторых случаях представляет собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая в себя ткань головного мозга, например гиппокампальную ткань.

В некоторых случаях способы приводят к одному или нескольким структурным изменениям в одной или нескольких тканях. Ткань может быть различной и в некоторых случаях представляет собой ткань нервной системы, например ткань центральной нервной системы, включая в себя ткань головного мозга, например гиппокампальную ткань. Представляющие интерес структурные изменения включают в себя увеличение плотности дендритных шипиков зрелых нейронов в зубчатой извилине (DG) гиппокампа, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях модуляция гиппокампальной структуры проявляется в виде усиленного формирования или функции синапсов, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях способы могут приводить к усилению длительной потенциации, например, по сравнению с подходящим контролем.

В некоторых случаях осуществление на практике способов, например, как описано выше, приводит к увеличению нейрогенеза у взрослого млекопитающего.

Увеличение можно идентифицировать различными путями, например, как описано ниже в экспериментальном разделе. В некоторых случаях увеличение нейрогенеза проявляется в виде увеличения количества Dcx-положительных незрелых нейронов, например, при этом увеличение может являться 1,5-кратным или больше. В некоторых случаях увеличение нейрогенеза проявляется в виде увеличения количества BrdU/NeuN-положительных клеток, при этом увеличение может являться 1,5-кратным или больше.

В некоторых случаях способы приводят к усилению обучения и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем. Усиление в обучении и памяти можно оценить многочисленными различными путями, например с помощью парадигм контекстуального условно-рефлекторного замирания, лабиринта Барнеса и/или радиального многорукавного водного лабиринта (RAWM), описанных в экспериментальном разделе ниже. При измерении с помощью контекстуального условно-рефлекторного замирания лечение в некоторых случаях приводит к увеличенному застыванию в контекстуальном, но не в стимулированном исследовании памяти. При измерении с помощью лабиринта Барнеса лечение в некоторых случаях приводит к усиленному обучению и запоминанию места расположения выходного отверстия во время фазы испытания в задании в любой день задания. При измерении с помощью RAWM лечение в некоторых случаях приводит к усиленному обучению и запоминанию расположения платформы во время фазы испытания в задании. В некоторых случаях лечение проявляется в виде усиленного улучшения когнитивных способностей в зависимом от гиппокампа обучении и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы можно провести в сочетании с активным средством, характеризующимся активностью, подходящей для лечения ассоциированного со старением когнитивного нарушения. Например, ряд активных средств, как было показано, характеризуются некоторой эффективностью в лечении когнитивных симптомов болезни Альцгеймера (например, потери памяти, путаного мышления и проблем с мышлением и рассуждением), например ингибиторы холинэстеразы (например, донепезил, ривастигмин, галантамин, такрин), мемантин и витамин Е. В качестве другого примера было показано, что ряд средств характеризуются некоторой эффективностью в лечении поведенческих или психиатрических симптомов болезни Альцгеймера, например циталопрам (Celexa), флуоксетин (Prozac), пароксеин (Paxil), сертралин (Zoloft), тразодон (Desyrel), лоразепам (Ativan), оксазепам (Serax), арипипразол (Abilify), клозапин (Clozaril), галоперидол (Haldol), оланзапин (Zyprexa), кветиапин (Seroquel), рисперидон (Risperdal) и зипрасидон (Geodon).

В некоторых случаях способы осуществляют на практике в сочетании с одним или несколькими дополнительными, не являющимися полипептидами ТИМР активными средствами, при этом такие не являющиеся полипептидом ТИМР активные средства проявляют требуемую активность против ассоции-

рованного со старением состояния, например, как описано выше. Примеры таких не являющихся полипептидом TIMP активных средств включают в себя, без ограничения, следующее: лиганд 2 хемокина (мотив С-С) (CCL2) (т.е. MCP1) и хемокин 11 с мотивом С-С (т.е. хемотаксический белок или зотаксин-1) и их агонисты/миметики (например, как описано в опубликованной заявке № 20130040844, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки); гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (т.е. колониестимулирующий фактор 2 или CSF2); и т.д. В таких случаях активное средство может относиться к любому типу приемлемого активного средства, включая в себя те типы средств, обсуждаемые выше в сочетании с активными средствами TIMP, например полипептидами и их миметиками/фрагментами, малыми молекулами, нуклеиновыми кислотами, потенцирующими средствами и т.д.

Согласно некоторым аспектам предусмотренных способов дополнительно предусматривает стадию измерения познавательной способности и/или синаптической пластичности после лечения, например, с использованием способов, описанных в настоящем документе или известных в настоящей области техники, и определения того, что скорость снижения когнитивных способностей или потери синаптической пластичности снизилась и/или что когнитивная способность или синаптическая пластичность улучшилась у индивидуума. В некоторых таких случаях определение проводят путем сравнения результатов испытания познавательной способности или синаптической пластичности с результатами испытания, проведенного на том же индивидууме в более ранний момент времени, например на 2 недели раньше, на 1 месяц раньше, на 2 месяца раньше, на 3 месяца раньше, на 6 месяцев раньше, на 1 год раньше, на 2 года раньше, на 5 лет раньше или на 10 лет раньше или больше.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные способы дополнительно предусматривают диагностирование индивидуума как характеризующегося наличием когнитивного нарушения, например, с использованием способов, описанных в настоящем документе или известных в настоящей области техники для измерения познавательной способности и синаптической пластичности, до введения субъекта плазмосодержащего препарата крови. В некоторых случаях диагностирование будет предусматривать измерение познавательной способности и/или синаптической пластичности и сравнение результатов испытания познавательной способности или синаптической пластичности с одним или несколькими эталонными значениями, например, положительным контролем и/или отрицательным контролем. Например, эталонное значение может представлять собой результат(ы) испытания, проведенного с помощью одного или нескольких совпадающих по возрасту индивидуумов, которые испытывают ассоциированные со старением когнитивные нарушения (т.е. положительные контроли) или которые не испытывают ассоциированные со старением когнитивные нарушения (т.е. отрицательные контроли). В качестве другого примера эталонное значение может представлять собой результат(ы) испытания, проведенного на том же индивидууме в более ранний момент времени, примерно на 2 недели раньше, на 1 месяц раньше, на 2 месяца раньше, на 3 месяца раньше, на 6 месяцев раньше, на 1 год раньше, на 2 года раньше, на 5 лет раньше или на 10 лет раньше или больше.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные способы дополнительно предусматривают диагностирование индивидуума как характеризующегося наличием ассоциированного со старением расстройства, например следующего: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, спинальная мышечная атрофия, рассеянный склероз, множественная системная атрофия, глаукома, атаксия, мышечная дистрофия, деменция и подобное. Способы диагностирования таких ассоциированных со старением расстройств хорошо известны в настоящей области техники, при этом специалист в настоящей области техники может использовать любой из них в диагностировании индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные способы дополнительно предусматривают диагностирование индивидуума как характеризующегося наличием ассоциированного со старением расстройства, так и характеризующегося наличием когнитивного нарушения.

Применимость.

Предусмотренные способы находят применение в лечении, включая в себя профилактику, ассоциированных со старением нарушений и состояний, ассоциированных с ними, таких как нарушения когнитивной способности индивидуумов. Индивидуумы, страдающие от ассоциированных со старением когнитивных нарушений или подверженные риску их развития, включают в себя индивидуумов, возраст которых составляет приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и, как правило, не старше чем 100 лет, т.е. в диапазоне возрастов, составляющем приблизительно 50-100 лет, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет и которые страдают от когнитивного нарушения, ассоциированного с процессом естественного старения, например умеренного когнитивного нарушения (M.C.I.); и индивидуумов, возраст которых составляет приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и, как правило, не старше чем 100 лет, т.е. в диапазоне возрастов, составляющем приблизительно 50-90 лет, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет, которые еще не продемонстрировали симптомы когнитивного нарушения. Примеры когнитивных нарушений, которые обусловлены естественным старением, включают в себя следующие.

Умеренное когнитивное нарушение (M.C.I.) представляет собой небольшое нарушение познавательной способности, которое проявляется в виде проблем с памятью или другими мыслительными функциями, такими как планирование, следование инструкциям или принятие решений, которые с течением времени ухудшились, при этом общая мыслительная функция и повседневная деятельность не ослаблены. Таким образом, несмотря на то, что значительная гибель нейронов, как правило, не происходит, нейроны в стареющем головном мозге уязвимы для сублетальных возрастных изменений в структуре, целостности синапсов и молекулярной переработке на уровне синапса, каждое из которых ухудшает когнитивную функцию.

Индивидуумы, страдающие от ассоциированного со старением когнитивного нарушения или подверженные риску его развития, которые смогут получить положительный эффект от лечения с помощью предусмотренного плазмосодержащего препарата крови, например с помощью способов, раскрытых в настоящем документе, также включают в себя индивидуумов любого возраста, которые страдают от когнитивного нарушения, обусловленного ассоциированным со старением расстройством; и индивидуумов любого возраста, у которых диагностировали ассоциированное со старением расстройством, которое, как правило сопровождается когнитивным нарушением, при этом у индивидуума еще не начали проявляться симптомы когнитивного нарушения. Примеры таких ассоциированных со старением расстройств включают в себя следующие.

Болезнь Альцгеймера (AD).

Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующую, неуклонную потерю когнитивной функции, ассоциированную с избыточным количеством сенильных бляшек в коре головного мозга и подкорковом сером веществе, которая также характеризуется наличием β -амилоида и нейрофибриллярных сплетений, состоящих из тау-белка. Распространенная форма поражает лиц в возрасте >60 лет, и ее частота встречаемости увеличивается с возрастом. На ее долю приходится более 65% деменций у пожилых людей.

Причина болезни Альцгеймера неизвестна. Заболевание протекает в семьях приблизительно в 15-20% случаев. Оставшиеся, так называемые спорадические случаи характеризуются некоторыми генетическими детерминантами. Заболевание характеризуется аутосомным доминантным генетическим характером в большинстве случаев с ранним началом и некоторых случаях с поздним началом, но с переменной пенетрантностью в пожилом возрасте. Активные исследования сфокусированы на факторах окружающей среды.

В течение заболевания происходит потеря синапсов и в конечном итоге нейронов в пределах коры головного мозга, гиппокампа и подкорковых структур (включая в себя селективную потерю клеток в базальном ядре Мейнерта), голубого пятна и дорсального ядра шва. Потребление глюкозы головным мозгом и перфузия головного мозга снижаются в некоторых областях головного мозга (кора теменной доли и височная кора при заболевании на ранней стадии, префронтальная кора при заболевании на поздней стадии). Нейритические или сенильные бляшки (состоящие из нейритов, астроцитов и глиальных клеток вокруг амилоидного ядра) и нейрофибриллярные сплетения (состоящие из парных спиральных филаментов) играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Сенильные бляшки и нейрофибриллярные сплетения появляются при нормальном старении, но они гораздо более распространены у лиц с болезнью Альцгеймера.

Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (PD) представляет собой идиопатическое, медленно прогрессирующее, дегенеративное расстройство ЦНС, характеризующееся медленной и уменьшенной двигательной активностью, мышечной ригидностью, тремором в покое и постуральной неустойчивостью. Первоначально PD считали прежде всего двигательным расстройством, теперь признается также ее влияние на познавательную способность, поведение, сон, функцию саморегуляции и сенсорную функцию. Наиболее распространенные когнитивные нарушения включают в себя нарушение внимания и концентрации, кратковременную память, исполнительные функции, порождение речи и функцию пространственного зрения.

При первичной болезни Паркинсона утрачиваются пигментированные нейроны черной субстанции, голубого пятна и других групп дофаминергических клеток ствола головного. Причина этого неизвестна. Потеря нейронов черной субстанции, что отражается на хвостатом ядре и скорлупе, приводит к истощению нейромедиатора дофамина в указанных областях. Начало, как правило, приходится на возраст после 40 лет, с увеличением частоты возникновения в группах старшего возраста.

Вторичный паркинсонизм является результатом потери или препятствия действию дофамина в базальных ганглиях вследствие других идиопатических дегенеративных заболеваний, лекарственных средств или экзогенных токсинов. Наиболее распространенная причина вторичного паркинсонизма представляет собой прием антипсихотических лекарственных средств или резерпина, которые вызывают паркинсонизм путем блокирования дофаминовых рецепторов. Менее распространенные причины включают в себя отравление угарным газом или марганцем, гидроцефалию, структурные поражения (опухоли, инфаркты, поражающие средний мозг или базальные ганглии), субдуральную гематому и дегенеративные расстройства, включая в себя стриатонигральную дегенерацию.

Лобно-височная деменция. Лобно-височная деменция (FTD) представляет собой состояние, являю-

шееся результатом прогрессирующего разрушения лобной доли головного мозга. С течением времени дегенерация может продвигаться к височной доле. Уступая по распространенности лишь болезни Альцгеймера (AD), на долю FTD приходится 20% случаев пресенильной деменции. Симптомы классифицируют на три группы на основании функций пораженных лобной и височной долей: поведенческий вариант FTD (bvFTD), симптомы которого включают в себя сильную вялость и аспонтанность с одной стороны, и расторможенность с другой; прогрессирующая небыстрая афазия (PNFA), при которой наблюдается нарушение беглости речи из-за сложности артикуляции, фонологические и/или синтаксические ошибки, но сохраняется понимание слов; и семантическая деменция (SD), при которой пациенты свободно владеют нормальной фонологией и синтаксисом, но все чаще сталкиваются с трудностями в назывании и понимании слов. Другие когнитивные симптомы, общие для всех пациентов с FTD, включают в себя нарушение исполнительных функций и способности сосредоточиться. Другие когнитивные способности, включая в себя восприятие, навыки пространственных восприятий и представлений, память и праксис, как правило, остаются неизменными. FTD можно диагностировать путем выявления атрофии лобной доли и/или передней височной доли на томограммах структурной МРТ.

Существует ряд форм FTD, любую из которых можно лечить или подвергать профилактике с использованием предусмотренных способов и композиций. Например, одной формой лобно-височной деменции является семантическая деменция (SD). SD характеризуется потерей семантической памяти как в вербальных, так и невербальных доменах. Пациенты с SD часто жалуются на трудности с подбором слов. Клинические признаки включают в себя быструю афазию, аномию, нарушение понимания значения слова и ассоциативную визуальную агнозию (невозможность сопоставления семантически связанных изображений или объектов). По мере прогрессирования заболевания часто встречаются поведенческие изменения и изменения личности, сходные с наблюдаемыми при лобно-височной деменции, хотя были описаны случаи "чистой" семантической деменции с несколькими поздними поведенческими симптомами. Структурная МРТ показывает характерную картину атрофии в височных долях (преимущественно слева), с большим вовлечением расположенных ниже областей, чем поражение верхних областей, а атрофия передней височной доли больше, чем атрофия задней.

В качестве другого примера другой формой лобно-височной деменции является болезнь Пика (PiD, также PcD). Определяющей характеристикой заболевания является накопление тау-белков в нейронах, накапливающихся в окрашивающихся серебром, сферических скоплениях, известных как "тельца Пика". Симптомы включают в себя потерю речи (афазию) и деменцию. Пациенты с орбитофронтальной дисфункцией могут стать агрессивными и социально неадекватными. Они могут красть или демонстрировать навязчивое или повторяющееся стереотипное поведение. Пациенты с дорсомедиальной или дорсолатеральной лобной дисфункцией могут демонстрировать отсутствие заинтересованности, апатию или снижение спонтанности. Пациенты могут продемонстрировать отсутствие самоконтроля, аномальное самосознание и неспособность оценить смысл. Пациенты с потерей серого вещества в двусторонней заднелатеральной орбитофронтальной коре и правой передней островковой доле большого мозга могут демонстрировать изменения в пищевом поведении, такие как патологическое пристрастие к сладкому. У пациентов с более очаговой потерей серого вещества в переднебоковой орбитофронтальной коре может развиваться гиперфагия. Хотя некоторые из симптомов вначале можно облегчить, заболевание прогрессирует и пациенты часто умирают в течение двух-десяти лет.

Болезнь Гентингтона.

Болезнь Гентингтона (HD) представляет собой наследственное прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, характеризующееся развитием эмоциональных, поведенческих и психиатрических аномалий; потерей интеллектуального или когнитивного функционирования; и аномалиями в движении (двигательными нарушениями). Классические признаки HD включают в себя развитие хореи - непроизвольные, быстрые, нерегулярные, отрывистые движения, которые могут поражать лицо, руки, ноги или туловище, а также снижение когнитивных способностей, включая в себя постепенную потерю мыслительной обработки и приобретенных интеллектуальных способностей. Может наблюдаться нарушение памяти, абстрактного мышления и суждения; неправильное восприятие времени, места или идентичности (дезориентация); увеличенное возбуждение и изменения личности (дезинтеграция личности). Хотя симптомы, как правило, проявляются в течение четвертого или пятого десятилетий жизни, возраст начала заболевания варьирует и находится в диапазоне от раннего детства до позднего взросления (например, 7- или 8-е десятилетия).

HD передается внутри семей как аутосомно-доминантный признак. Расстройство происходит в результате аномально длинных последовательностей или "повторов" кодированных инструкций внутри гена на хромосоме 4 (4p16.3). Прогрессирующая потеря функции нервной системы, ассоциированная с HD, является результатом потери нейронов в определенных областях головного мозга, включая в себя базальные ганглии и кору головного мозга.

Боковой амиотрофический склероз.

Боковой амиотрофический склероз (ALS) представляет собой быстро прогрессирующее, неизменно приводящее к смертельному исходу неврологическое заболевание, которое поражает моторные нейроны. Мышечная слабость и атрофия, а также признаки дисфункции моторного нейрона переднего рога спин-

ного мозга изначально отмечаются чаще всего в руках и реже в ногах. Место начала является случайным, а прогрессирование асимметрично. Судороги являются распространенными и могут предшествовать слабости. Редко пациент живет 30 лет; 50% умирают в течение 3 лет, 20% живут 5 лет и 10% живут 10 лет. Диагностические признаки включают начало в середине взрослой жизни или позже и прогрессирующее, генерализованное вовлечение моторных функций без сенсорных аномалий. Скорости проводимости нервов являются нормальными до поздней стадии заболевания. Недавние исследования также зафиксировали проявления когнитивных нарушений, в частности сокращение немедленной словесной памяти, зрительной памяти, речи и исполнительных функций.

Сообщалось о снижении площади поверхности клеток, количества синапсов и общей длины синапсов даже нормальных нейронов у пациентов с ALS. Было высказано предположение, что, когда пластичность активной зоны достигает своего предела, продолжающаяся потеря синапсов может привести к функциональному нарушению. Стимуляция либо образования новых синапсов, либо предотвращения потери синапсов может поддерживать функцию нейронов у этих пациентов.

Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (MS) характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС, с ремиссиями и повторяющимися обострениями. Наиболее распространенными симптомами являются парестезии в одной или нескольких конечностях, в туловище или на одной стороне лица; слабость или неуклюжесть ноги либо руки или зрительные нарушения, например частичная слепота и боль в одном глазу (ретробульбарный оптический неврит), тусклость зрения или скотома. Распространенные когнитивные нарушения включают в себя нарушения памяти (приобретение, сохранение и воспроизведение новой информации), внимания и концентрации (в частности, распределенного внимания), обработки информации, исполнительных функций, функций пространственного зрения и беглости речи. Обычными ранними симптомами являются паралич глаза, вызывающий двоение в глазах (диплопию), преходящую слабость одной или нескольких конечностей, небольшую тугоподвижность или необычную утомляемость конечностей, незначительные нарушения походки, трудности с контролем мочевого пузыря, головокружение и легкие эмоциональные нарушения; все указывают на разбросанное вовлечение ЦНС и часто происходят за несколько месяцев или лет до того, как болезнь распознана. Избыток тепла может усиливать симптомы и признаки.

Течение очень изменчиво, непредсказуемо и у большинства пациентов является ремиттирующим. Сначала эпизоды болезни могут разделять месяцы или годы ремиссии, особенно когда болезнь начинается с ретробульбарного оптического неврита. Однако у некоторых пациентов атаки происходят часто, и они быстро становятся нетрудоспособными; для некоторых пациентов течение может являться быстро прогрессирующим.

Глаукома. Глаукома представляет собой распространенное нейродегенеративное заболевание, которое поражает ганглиозные клетки сетчатки (RGC). Доказательства подтверждают существование отдельных программ дегенерации в синапсах и дендритах, в том числе в RGC. Недавние данные также свидетельствуют о корреляции между когнитивным нарушением у пожилых людей и глаукомой (Yochim BP, et al., Prevalence of cognitive impairment, depression, and anxiety symptoms among older adults with glaucoma. *J. Glaucoma.* 2012; 21(4):250-254).

Миотоническая дистрофия.

Миотоническая дистрофия (DM) представляет собой аутосомно-доминантное мультисистемное расстройство, характеризующееся дистрофической мышечной слабостью и миотонией. Молекулярный дефект представляет собой расширенный тринуклеотидный (CTG) повтор в 3'-нетранслируемой области гена миотонин-протеинкиназы на хромосоме 19q. Симптомы могут возникать в любом возрасте, и диапазон клинической тяжести является широким. Миотония проявляется в мышцах рук, а птоз является распространенным даже в легких случаях. В тяжелых случаях отмечается выраженная периферическая мышечная слабость, часто с катарактой, преждевременным облысением, характерным для миотонии выражением лица, сердечными аритмиями, атрофией яичек и эндокринными аномалиями (например, сахарным диабетом). Умственная отсталость распространена в тяжелых врожденных формах, тогда как связанное со старением снижение когнитивных функций лобных и височных долей, особенно речевых и исполнительных функций, наблюдается в более умеренных формах расстройства у взрослых. Серьезно пораженные люди умирают в первой половине пятого десятилетия.

Деменция.

Деменция описывает класс расстройств, характеризующихся симптомами, влияющими на мышление и социальные способности, достаточно тяжелые, чтобы препятствовать осуществлению повседневной деятельности. Другие случаи деменции в дополнение к деменции, наблюдаемые на более поздних стадиях ассоциированных со старением расстройств, которые обсуждались выше, включают в себя сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви, описанную ниже.

При сосудистой деменции, или "мультиинфарктной деменции", когнитивное нарушение вызвано проблемами в поступлении крови в головной мозг, как правило, вследствие ряда микроинсультов или иногда одного большого инсульта, которому предшествовали или за которым следовали другие меньшие инсульты. Поражения сосудов могут являться результатом диффузного цереброваскулярного заболева-

ния, такого как заболевание малых сосудов или очаговые поражения или и то, и другое. Пациенты, страдающие сосудистой деменцией, проявляют когнитивное нарушение, остро или подостро, после острого цереброваскулярного нарушения, после чего наблюдается прогрессирующее снижение когнитивных способностей. Когнитивные нарушения сходны с теми, которые наблюдаются при болезни Альцгеймера, включая в себя нарушения речи, памяти, сложную визуальную обработку или исполнительные функции, хотя связанные изменения в головном мозге обусловлены не патологией AD, а хроническим уменьшением кровотока в головном мозге, в конечном итоге приводя к деменции. Нейровизуализацию с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (СПЕКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) можно использовать для подтверждения диагноза мультиинфарктной деменции в сочетании с оценками, включающими в себя исследование психического статуса.

Деменция с тельцами Леви (DLB, также известная под различными другими названиями, включая в себя следующие: деменция телец Леви, болезнь диффузных телец Леви, кортикальная болезнь с тельцами Леви и сенильная деменция типа Леви) представляет собой тип деменции, характеризующейся анатомически наличием телец Леви (скоплений альфа-синуклеина и белка убиквитина) в нейронах, обнаруживаемых в гистологии головного мозга после смерти. Ее основным признаком является снижение когнитивных способностей, в частности исполнительных функций. Внимательность и краткосрочная память будут расти и падать. Стойкие или повторяющиеся визуальные галлюцинации с яркими и подробными изображениями часто являются ранним диагностическим симптомом. DLB часто путают на ранних стадиях с болезнью Альцгеймера и/или сосудистой деменцией, хотя, в то время как болезнь Альцгеймера обычно начинается довольно постепенно, DLB часто имеет быстрое или острое начало. Симптомы DLB также включают в себя двигательные симптомы, сходные с симптомами болезни Паркинсона. DLB отличается от деменции, которая иногда возникает при болезни Паркинсона, по срокам, когда симптомы деменции появляются относительно симптомов болезни Паркинсона. Диагноз болезнь Паркинсона с деменцией (PDD) можно поставить, когда начало деменции происходит более чем через год после начала болезни Паркинсона. DLB диагностируют, когда когнитивные симптомы начинаются в одно и то же время или в течение года от начала симптомов болезни Паркинсона.

Прогрессирующий надъядерный паралич.

Прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) представляет собой расстройство головного мозга, которое вызывает серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем походки и равновесия, а также сложными движениями глаз и проблемами мышления. Одним из классических признаков заболевания является невозможность правильно наводить взгляд на цель, что происходит из-за повреждений в области головного мозга, которая координирует движения глаз. Некоторые индивидуумы описывают этот эффект как размытие изображения. Пораженные индивидуумы часто демонстрируют изменения настроения и поведения, включая в себя депрессию и апатию, а также прогрессирующую умеренную деменцию. Название расстройства указывает на то, что заболевание начинается медленно и продолжает ухудшаться (прогрессирующее) и вызывает слабость (паралич) путем разрушения определенных частей головного мозга выше структур размером с горошину, называемых ядра, которые контролируют движения глаз (надъядерный). PSP впервые описан как отдельное расстройство в 1964 г., когда трое ученых опубликовали статью, в которой описаны отличия состояния от болезни Паркинсона. Его иногда называют синдромом Стила-Ричардсона-Ольшевского, который отражает объединенные имена ученых, которые определили расстройство. Хотя PSP прогрессирующе ухудшается, никто не умирает от самого PSP.

Атаксия.

У людей с атаксией есть проблемы с координацией, потому что поражены части нервной системы, которые контролируют движение и равновесие. Атаксия может поражать пальцы рук, ладони, руки, ноги, тело, речь и движения глаз. Слово "атаксия" часто используется для описания симптома несогласованности, который может быть связан с инфекциями, травмами, другими заболеваниями или дегенеративными изменениями в центральной нервной системе. Слово "атаксия" также используют для обозначения группы специфических дегенеративных заболеваний нервной системы, называемых наследственными и спорадическими атаксиями, которым Национальный фонд по борьбе с атаксией уделяет первостепенное внимание.

Множественная системная атрофия.

Множественная системная атрофия (MSA) представляет собой дегенеративное неврологическое расстройство. MSA ассоциирована с дегенерацией нервных клеток в конкретных областях головного мозга. Эта дегенерация клеток вызывает проблемы с движением, равновесием и другими автономными функциями организма, такими как контроль мочевого пузыря или регуляция кровяного давления. Причина MSA неизвестна, и конкретные факторы риска не идентифицированы. Около 55% случаев встречаются у мужчин с типичным возрастом начала заболевания, составляющим конец пятого десятилетия - начало шестого десятилетия. MSA часто проявляется некоторыми из тех же симптомов, что и болезнь Паркинсона. Тем не менее пациенты с MSA обычно демонстрируют минимальный, если он вообще существует, ответ на дофаминовые лекарственные средства, используемые для лечения болезни Паркинсона.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные способы и композиции находят

применение в замедлении прогрессирования ассоциированного со старением когнитивного нарушения. Иными словами, когнитивные способности у индивидуума будут снижаться медленнее после лечения с помощью раскрытых способов, чем до или при отсутствии лечения с помощью раскрытых способов. В некоторых таких случаях предусмотренные способы лечения включают в себя измерение прогрессирования снижения когнитивных способностей после лечения и определение того, что прогрессирование снижения когнитивных способностей снижается. В некоторых таких случаях определение осуществляют путем сравнения с эталонным показателем, например скоростью снижения когнитивных способностей у индивидуума до лечения, например, что определяют с помощью измерения познавательной способностью в двух или больше моментах времени перед введением предусмотренного препарата крови.

Предусмотренные способы и композиции также находят применение в стабилизации когнитивных способностей индивидуума, например индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, или индивидуума, подверженного риску развития ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Например, индивидуум может демонстрировать некоторое ассоциированное со старением когнитивное нарушение, и прогрессирование когнитивного нарушения, наблюдаемое до лечения с помощью раскрытых способов, будет останавливаться после лечения с помощью раскрытых способов. В качестве другого примера индивидуум может подвергаться риску развития ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей (например, возраст индивидуума может составлять 50 лет или старше или у него может быть диагностировано ассоциированное со старением нарушение), и когнитивные способности индивидуума являются по существу неизменными, т.е. можно обнаружить отсутствие снижения когнитивных способностей после лечения с помощью раскрытых способов по сравнению с состоянием до лечения с помощью раскрытых способов.

Предусмотренные способы и композиции также находят применение в снижении когнитивного нарушения у индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением когнитивного нарушения. Иными словами, когнитивная способность улучшается у индивидуума после лечения с помощью предусмотренных способов. Например, увеличение когнитивной способности у индивидуума является, например, 2-кратным или больше, 5-кратным или больше, 10-кратным или больше, 15-кратным или больше, 20-кратным или больше, 30-кратным или больше или 40-кратным или больше, включая в себя 50-кратное или больше, 60-кратное или больше, 70-кратное или больше, 80-кратное или больше, 90-кратное или больше или 100-кратное или больше, после лечения с помощью предусмотренных способов по отношению к когнитивной способности, которую наблюдали у индивидуума до лечения с помощью предусмотренных способов. В некоторых случаях лечение с помощью предусмотренных способов и композиций восстанавливает когнитивную способность у индивидуума, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, например, до ее уровня, когда возраст индивидуума составлял приблизительно 40 лет или меньше. Иными словами, когнитивное нарушение устраняется.

Комбинированные виды терапии.

Активные средства согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту отдельно или в комбинации с дополнительным, т.е. вторым активным средством. Таким образом, в некоторых случаях предусмотренный способ дополнительно предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного соединения. Можно использовать любые подходящие средства. Например, активные средства ТИМР можно вводить отдельно или в сочетании с одним или несколькими другими лекарственными средствами, такими как лекарственные средства, используемые в лечении ассоциированных со старением состояний, например ингибиторы холинэстеразы (например, донепезил, ривастигмин, галантамин, такрин), мемантин, витамин Е, циталопрам (Celexa), флуоксетин (Prozac), пароксеин (Paxil), сертралин (Zoloft), тразодон (Desyrel), лоразепам (Ativan), оксазепам (Serax), арипипразол (Abilify), клозапин (Clozaril), клозапин (Haldol), оланзапин (Zyprexa), кветиапин (Seroquel), рисперидон (Risperdal) и зипрасидон (Geodon); не являющиеся полипептидом ТИМР активные средства; например лиганд 2 хемокина (мотив С-С) (CCL2) (т.е. MCP1); хемокин 11 с мотивом С-С (т.е. хемотаксический белок или эотаксин-1); гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (т.е. колониестимулирующий фактор 2 или CSF2) и т.д.

Термины "совместное введение" и "в комбинации с" включают в себя введение двух или больше терапевтических средств либо одновременно, параллельно или последовательно без каких-либо конкретных временных ограничений. Согласно одному варианту осуществления средства присутствуют в клетке или в организме субъекта в одно и то же время или проявляют свой биологический или терапевтический эффект в одно и то же время. Согласно одному варианту осуществления терапевтические средства находятся в одной и той же композиции или единичной лекарственной форме. Согласно другим вариантам осуществления терапевтические средства находятся в отдельных композициях или единичных лекарственных формах. Согласно определенным вариантам осуществления первое средство можно вводить перед (например, за 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель), одновременно или последовательно (например, через 5, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель) после введения второго терапевтического средства.

"Совместное введение" известного терапевтического лекарственного средства с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению означает введение лекарственного средства и нуклео-

зидного средства в такое время, чтобы как известное лекарственное средство, так и композиция согласно настоящему изобретению обладали терапевтическим эффектом. Такое совместное введение может включать в себя одновременное (т.е. в одно и то же время), до или после введения лекарственного средства по отношению к введению предусмотренного нуклеозидного средства. Пути введения двух средств могут варьировать, при этом репрезентативные пути введения описаны более подробно ниже. Специалист в настоящей области техники без труда определит соответствующий хронометраж, последовательность и дозировки введения для конкретных лекарственных средств и нуклеозидных средств согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединения вводят субъекту в пределах 24 ч друг от друга, например, в пределах 12 ч друг от друга, в пределах 6 ч друг от друга, в пределах 3 ч друг от друга или в пределах 1 ч друг от друга. Согласно определенным вариантам осуществления соединения вводят в пределах 1 ч друг от друга. Согласно определенным вариантам осуществления соединения вводят по существу одновременно. Под введенным по существу одновременно подразумевается, что соединения вводят субъекту в пределах приблизительно 10 мин или меньше друг от друга, например, в пределах 5 мин или меньше или 1 мин или меньше друг от друга.

Фармацевтические препараты.

Кроме того, предусмотрены фармацевтические препараты предусмотренных соединений. Предусмотренные соединения можно ввести в разнообразные составы для введения субъекту. Более конкретно, соединения согласно настоящему изобретению можно составить в фармацевтические композиции путем комбинации с соответствующими, фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и можно составить в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, такие как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, средства для ингаляции и аэрозоли. Составы можно разработать для введения посредством различных путей, включая в себя пероральное, буккальное, ректальное, парентеральное, интраперитонеальное, интрадермальное, трансдермальное, интратрахеальное и т.д. введение.

В фармацевтических лекарственных формах средства можно вводить в форме их фармацевтически приемлемых солей или их также можно использовать отдельно или в соответствующей ассоциации, а также в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Следующие способы и вспомогательные вещества являются исключительно иллюстративными и ни в коем случае не являются ограничивающими.

Фармацевтические композиции, содержащие активный ингредиент, могут находиться в форме, подходящей для перорального применения, например в виде таблеток, пастилок, леденцов, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул, или сиропов, или эликсиров. Композиции, предназначенные для перорального применения, можно получить согласно любому способу, известному в настоящей области техники, для производства фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать одно или несколько средств, выбранных из группы, состоящей из следующего: подсластители, вкусоароматические средства, красящие средства и консерванты, для обеспечения фармацевтически простых и приятных по виду, на вкус и вид препаратов. Таблетки содержат активный ингредиент в смеси с нетоксическими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые являются подходящими для производства таблеток. Указанные вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие средства и разрыхлители, например кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связывающие средства, например крахмал, желатин или аравийская камедь, и смазывающие средства, например стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут не содержать оболочек или на них можно нанести оболочки с помощью известных техник для задержки разложения и абсорбции в желудочно-кишечном тракте и, тем самым, обеспечивают пролонгированное действие в течение более продолжительного периода времени. Например, можно использовать такой материал для обеспечения временной задержки, как глицерилмоносреарат или глицерилдистеарат. Таблетки также можно покрыть оболочками с помощью техники, описанной в патентах США № 4256108; 4166452 и 4265874 для образования осмотических терапевтических таблеток для контролируемого высвобождения.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, где активные ингредиенты смешаны с водой или масляной средой, например арахисовым маслом, вазелиновым маслом или оливковым маслом.

Водные суспензии содержат активный материал в смеси со вспомогательными веществами, подходящими для производства водных суспензий. Такие вспомогательные вещества представляют собой суспендирующие средства, например натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийальгинат, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие средства могут представлять собой встречающийся в природе фосфатид, например лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например по-

лиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с частичными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такие как полиоксиэтиленсорбитмоноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с частичными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, например этил или n-пропил, p-гидроксibenзоат, одно или несколько красящих средств, одно или несколько вкусоароматических средств и один или несколько подсластителей, таких как сахароза, сахарин или аспартам.

Масляные суспензии можно составить путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как вазелиновое масло. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, такие как представленные выше, и вкусоароматические средства можно добавить для обеспечения приятного на вкус перорального препарата. Указанные композиции можно сохранить путем добавления такого антиоксиданта, как аскорбиновая кислота.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим средством, суспендирующим средством и одним или несколькими консервантами. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств представлены теми, которые упомянуты выше. Также могут присутствовать дополнительные вспомогательные вещества, например подсластители, вкусоароматические и красящие средства.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут находиться в форме эмульсий масло-в-воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например вазелиновое масло, или их смеси. Подходящие эмульгаторы могут представлять собой встречающиеся в природе фосфатиды, например соевое масло, лецитин и сложные эфиры или частичные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, например сорбитанмоноолеат, и продукты конденсации указанных частичных сложных эфиров с этиленоксидом, например полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсии также могут содержать подсластители и вкусоароматические средства.

Сиропы и эликсиры можно составить с помощью подсластителей, например глицерина, пропиленгликоля, сорбита или сахарозы. Такие составы также могут содержать смягчительное средство, консервант и вкусоароматические и красящие средства. Фармацевтические композиции могут находиться в форме стерильной инъекционной водной или масляной суспензии. Эту суспензию можно составить в соответствии с известным уровнем техники с использованием тех подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств, которые были упомянуты выше. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксическом приемлемом для парентерального введения растворителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых несущих сред и растворителей, которые можно использовать, можно назвать воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, нелетучие масла являются широко используемыми в качестве растворителя или суспендирующей среды. С этой целью можно использовать любое смешанное нелетучее масло, включая в себя синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в получении инъекционных препаратов.

Соединения можно составить в препараты для инъекций путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие сходные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и при необходимости с помощью общепринятых добавок, таких как солубилизаторы, изотонические средства, суспендирующие средства, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты.

Соединения можно использовать в составе аэрозоля, подлежащего введению посредством ингаляции. Соединения согласно настоящему изобретению можно составить в находящихся под давлением приемлемых пропеллентах, таких как дихлордифторметан, пропан, азот и подобное.

Более того, соединения можно составить в суппозитории путем смешивания с разнообразными основами, такими как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить ректально посредством суппозитория. Суппозиторий может включать в себя несущие среды, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, оставаясь в твердом состоянии при комнатной температуре.

Соединения согласно настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые соли, которые являются активными для местного введения, можно составить в виде трансдермальных композиций или устройств для трансдермальной доставки ("пластырей"). Такие композиции включают в себя, например, подложку, резервуар для активного соединения, мембрану контролируемого высвобождения, защитное покрытие и контактный клей. Такие трансдермальные пластыри можно использовать для обеспечения непрерывной или прерывистой инфузии соединений согласно настоящему изобретению в контролируе-

мых количествах. Конструкция и применение трансдермальных пластырей для доставки фармацевтических средств хорошо известны в настоящей области техники. См., например, патент США № 5023252, выданный 11 июня 1991 г., полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. Такие пластыри можно сконструировать для непрерывной, импульсной доставки или доставки фармацевтических средств по требованию.

Необязательно фармацевтическая композиция может содержать другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как буферы, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, модифицирующие вязкость средства, консерванты и подобное. Каждый из указанных компонентов является хорошо известным в настоящей области техники. См., например, патент США № 5985310, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Другие компоненты, подходящие для применения в составах согласно настоящему изобретению, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Согласно варианту осуществления водный раствор циклодекстрина дополнительно содержит декстрозу, например приблизительно 5% декстрозы.

Уровни дозировки порядка приблизительно 0,01-140 мг/кг массы тела в день являются применимыми в репрезентативных вариантах осуществления или, альтернативно, приблизительно 0,5-приблизительно 7 г на пациента в день. Например, воспаление можно эффективно лечить путем введения приблизительно 0,01-приблизительно 50 мг соединения на 1 кг массы тела в день или, альтернативно, приблизительно 0,5-приблизительно 3,5 г на пациента в день. Специалистам в настоящей области техники понятно, что уровни дозы могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и подверженности субъекта указанным эффектам. Специалисты в настоящей области техники могут легко определить дозировки для данного соединения с помощью разнообразных способов.

Количество активного ингредиента, который можно комбинировать с материалами-носителями для получения отдельной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от хозяина, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Например, состав, предназначенный для перорального введения людям, может содержать 0,5 мг - 5 г активного средства в сочетании с соответствующим и подходящим количеством материала-носителя, которое может варьировать от приблизительно 5 до приблизительно 95% общей композиции. Единичные лекарственные формы, как правило, будут содержать от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг активного ингредиента, как правило, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 или 1000 мг.

Тем не менее следует понимать, что конкретный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от разнообразных факторов, включая в себя возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, путь введения, скорость экскреции, комбинацию лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подвергающегося терапии.

Таким образом, можно предусмотреть единичные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, причем каждая единица дозирования, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит заданное количество композиции, содержащей один или несколько ингибиторов. Аналогично единичные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать ингибитор(ы) в композиции в виде раствора в стерильной воде, изотоническом растворе хлорида натрия или другом фармацевтически приемлемом носителе. Используемый в настоящем документе термин "единичная лекарственная форма" относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов-людей и животных, причем каждая единица содержит заданное количество соединений согласно настоящему изобретению, рассчитанное в количестве, достаточном для обеспечения требуемого эффекта в ассоциации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или несущей средой. Технические характеристики для новых единичных лекарственных форм согласно настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения и эффекта, который должен быть достигнут, а также фармакодинамики, связанной с каждым соединением в организме хозяина.

Наборы и системы.

Кроме того, предусмотрены наборы и системы, которые находят применение в осуществлении на практике вариантов осуществления способов, таких как способы, описанные выше. Используемый в настоящем документе термин "система" относится к набору из двух или больше различных активных средств, присутствующих в одной композиции или в отдельных композициях, которые собраны вместе для осуществления на практике предусмотренных способов. Термин "набор" относится к упакованному активному средству или средствам. Например, наборы и системы для осуществления на практике предусмотренных способов могут включать в себя один или несколько фармацевтических составов. Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления наборы могут включать в себя отдельную фармацевтическую композицию, присутствующую в виде одной или нескольких единичных дозировок, при этом композиция может включать в себя одно или несколько соединений-ингибиторов экспрессии/активности. Согласно другим вариантам осуществления наборы могут включать в себя две или больше отдельные фармацевтические композиции, каждая из которых содержит различное активное соединение.

Кроме того, интерес представляют наборы и системы, находящие применение в анализах согласно настоящему изобретению, например, как описано выше. Такие наборы и системы могут включать в себя один или несколько компонентов для анализов, например векторы, кодирующие белки слияния, субстраты ферментов, буферы и т.д.

В дополнение к вышеперечисленным компонентам предусмотренные наборы могут дополнительно включать в себя инструкции для практического осуществления предусмотренных способов. Указанные инструкции могут присутствовать в предусмотренных наборах в разнообразных формах, одна или несколько из которых может присутствовать в наборе. Одна форма, в которой могут присутствовать указанные инструкции, представляет собой печатную информацию на подходящем носителе или основе, например листок или листки бумаги, на которых напечатана информация, в упаковке набора, в листке-вкладыше в упаковке и т.д. Еще одно средство будет представлять собой машиночитаемый носитель, например дискету, CD, портативную карту флэш-памяти и т.д., на котором записана информация. Еще одно средство, которое может присутствовать, представляет собой адрес веб-сайта, который можно использовать с помощью сети Интернет для доступа к информации на удаленном сайте. В наборах могут присутствовать любое удобное средство.

Следующие примеры предусмотрены для иллюстрации, а не для ограничения.

Экспериментальная часть

Рекомбинантный белок TIMP2 доставляли в концентрации, составляющей 50 мкг/кг, четыре раза в течение недели с помощью интраперитонеальной инъекции пожилым мышам дикого типа (C57Bl/6J). В головном мозге получивших лечение мышей выявили повышенные содержания активных нейронов, а именно нейронов, экспрессирующих немедленный ранний ген *c-Fos* в подобласти зубчатой извилины гиппокампа. 8 (длительных) интраперитонеальных инъекций (50 мкг/кг) TIMP2 вводили пожилым мышам дикого типа через день до оценки в лабиринте Барнеса, гнездового поведения и состояния шерсти. Исследование поведения выявило значимо улучшенную активность во всех трех заданиях у получивших лечение с помощью TIMP2 мышей. 7 (длительных) интраперитонеальных инъекций (50 мкг/кг) TIMP2 вводили пожилым мышам дикого типа через день отдельно или в комбинации с другим стимулирующим познавательную способность фактором, CSF2. В головном мозге мышей, получивших лечение с помощью TIMP2 и TIMP2+ CSF2, выявили значимо повышенные содержания *c-Fos*⁺ (активных) нейронов в зубчатой извилине.

Результаты продемонстрировали, что TIMP2 являлся достаточным для повышения количества экспрессирующих *c-Fos* клеток в гиппокампе пожилых мышей. При введении системно в течение более продолжительного периода времени TIMP2 является достаточным для увеличения количества экспрессирующих *c-Fos* клеток, обратного развития недостаточности обучения и памяти в некоторых поведенческих парадигмах и восстановления нарушений в способности к гнездованию. Приведенные выше результаты демонстрируют, что TIMP2 является подходящим для обеспечения когнитивных благоприятных эффектов (обучение и память) в отношении пациентов, страдающих от возрастных когнитивных нарушений или нейродегенеративных заболеваний, которые снижают синаптическую функцию, например болезни Альцгеймера. Настоящее раскрытие представляет собой первое описание белка (TIMP2), содержание которого снижается с возрастом в крови, что можно использовать для обратного развития нарушений синаптической пластичности и возрастных нарушений обучения и памяти. TIMP2 при системном введении в течение периода, составляющего лишь ~2 недели, способен обеспечить усиленную пластичность и функцию памяти и обучения без необходимости прямой доставки в головной мозг.

Системное лечение с помощью TIMP2 пожилых мышей заметно улучшает длительную потенциацию, клеточный коррелят обучения и памяти. Срезы головного мозга, выделенные из пожилых мышей дикого типа, которых лечили с помощью рекомбинантного TIMP2 (i.p., 50 мкг/кг), проявляют усиленную длительную потенциацию (LTP) по сравнению с контролем (несущая среда). На фиг. 1A показаны амплитуды популяционного спайка (PSA) в пределах зубчатой извилины после стимуляции в перфорантном пути гиппокампа. Количественное определение фазы поддержания PSA, показанных на фиг. 1A, представлено на фиг. 1B. (среднее \pm SEM; t-критерий Стьюдента; * $P < 0,05$).

Системный TIMP2 является необходимым для зависимой от гиппокампа пространственной памяти, что оценивали в задании распознавания нового расположения. На содержания TIMP2 у молодых мышей дикого типа нацеленно воздействовали в течение приблизительно одного месяца с использованием подхода опосредованной антителами нейтрализации (60 мкг/кг) до оценки различения перемещения положения объектов после 24 ч тренировки. (Среднее \pm SEM; 2-факторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки; **** $P < 0,0001$) Результаты показаны на фиг. 2.

В настоящее время отсутствуют эффективные виды лечения значительного снижения синаптической пластичности, обучения/памяти и других когнитивных способностей, ассоциированных с нормальным старением головного мозга или нейродегенерацией. Авторы настоящего изобретения идентифицировали полученный из молодого организма белок, TIMP2, с сильной омолаживающей активностью. TIMP2 при системном введении в течение относительно короткого курса лечения способен обеспечивать усиленную пластичность и функцию памяти и обучения без необходимости прямой доставки в головной

мозг. TIMP2 не является фактором роста, а также не представляет собой каноническую иммунную сигнальную молекулу, что подчеркивает дополнительное преимущество, а именно в том, что TIMP2 дает возможность нацеленно воздействовать на процессы старения головного мозга без введения потенциально туморогенной или провоспалительной молекулы, которая может причинить вред другим системам органов. Более того, использование белка, полученного естественным образом и содержащегося в крови для ограничения когнитивной дисфункции, вряд ли приведет к возникновению вредных побочных эффектов по сравнению с традиционным дизайном малых молекул.

Отсутствуют эффективные терапевтические средства для лечения возрастных результатов старения ЦНС. Настоящий подход обеспечивает легкое, системное лечение пожилых пациентов или пациентов, иным образом страдающих от когнитивного нарушения, с помощью TIMP2, белка, в норме производимого в организме.

Несмотря на прилагаемые пункты, раскрытие также определяется следующими пунктами.

1. Способ лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего, причем способ предусматривает усиление активности TIMP у млекопитающего в достаточной степени для лечения ассоциированного со старением состояния у взрослого млекопитающего.

2. Способ по п.1, при котором активность TIMP представляет собой активность TIMP1, TIMP2, TIMP3 или TIMP4.

3. Способ по п.2, при котором активность TIMP представляет собой активность TIMP2.

4. Способ по любому из пп.1-3, причем способ предусматривает усиление системной активности TIMP.

5. Способ по любому из пп.1-4, причем способ предусматривает увеличение системного содержания активного средства TIMP у млекопитающего.

6. Способ по п.5, при котором системное содержание активного средства TIMP увеличивают путем введения активного средства TIMP млекопитающему.

7. Способ по п.6, при котором активное средство TIMP представляет собой полипептид TIMP или его миметик.

8. Способ по п.7, при котором активное средство TIMP представляет собой полипептид TIMP.

9. Способ по п.8, при котором полипептид TIMP характеризуется последовательностью, которая является по меньшей мере на 60% идентичной любой из SEQ ID NO: 1-4.

10. Способ по любому из пп.1-5, при котором способ предусматривает усиление экспрессии последовательности, кодирующей эндогенный TIMP.

11. Способ по пп.1-4, при котором способ предусматривает потенцирование TIMP у субъекта.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором млекопитающее представляет собой примата.

13. Способ по п.12, при котором примат представляет собой человека.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором взрослое млекопитающее представляет собой пожилое млекопитающее.

15. Способ по п.14, при котором пожилое млекопитающее представляет собой человека, возраст которого составляет 60 лет или старше.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором ассоциированное со старением состояние включает в себя когнитивное нарушение.

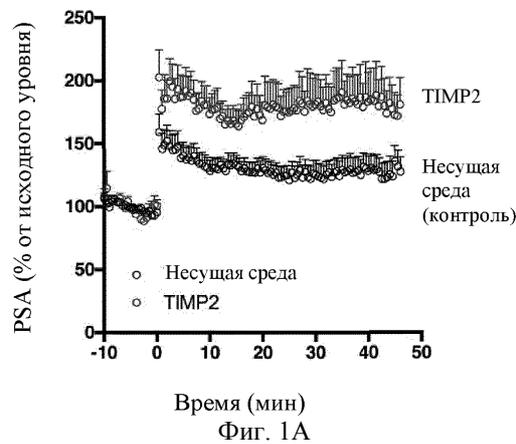
17. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором взрослое млекопитающее страдает от ассоциированного со старением болезненного состояния.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, при котором ассоциированное со старением болезненное состояние представляет собой болезненное состояние снижения когнитивных способностей.

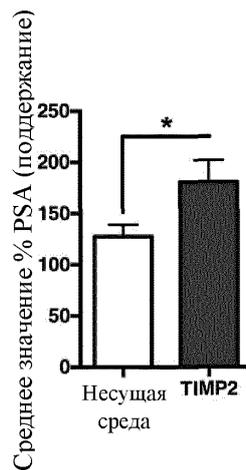
Изложенное выше только иллюстрирует принципы настоящего изобретения. Следует понимать, что специалисты в настоящей области техники смогут разработать различные способы реализации, которые, хотя они явно не описаны или не показаны в настоящем документе, воплощают принципы настоящего изобретения и включены в его сущность и объем. Более того, все примеры и условный язык, приведенные в настоящем документе, в основном предназначены для того, чтобы помочь читателю понять принципы настоящего изобретения и концепции, предоставленные авторами настоящего изобретения для развития настоящей области техники, и должны толковаться как не имеющие ограничений такими конкретно приведенными примерами и условиями. Более того, все утверждения, в которых изложены принципы, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, а также их конкретные примеры, предназначены охватывать как их структурные, так и функциональные эквиваленты. Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают в себя как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, разработанные в будущем, т.е. любые разработанные элементы, которые выполняют одинаковую функцию независимо от структуры. Следовательно, не предусмотрено, что объем настоящего изобретения ограничивается представленными и описанными в настоящем документе иллюстративными вариантами осуществления. Наоборот, объем и сущность настоящего изобретения воплощены в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

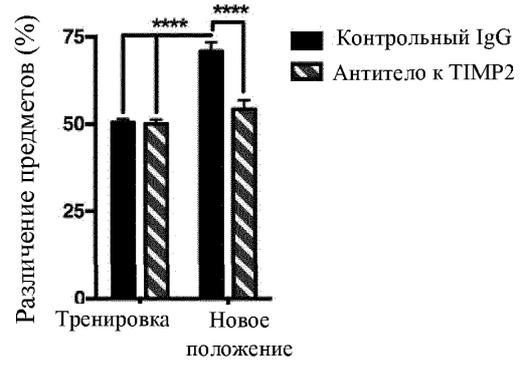
1. Применение тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (TIMP2) полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, для уменьшения ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности у взрослого млекопитающего, включающее введение TIMP2 полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей TIMP2 полипептид, млекопитающему для достаточного усиления активности TIMP2 у млекопитающего для уменьшения у взрослого млекопитающего ассоциированного со старением нарушения когнитивной способности или снижения когнитивной способности.
2. Применение по п.1, при котором системную активность TIMP2 усиливают.
3. Применение по п.1, причем системное содержание TIMP2 у млекопитающего увеличивают.
4. Применение TIMP2 полипептида по любому из пп.1-3.
5. Применение по п.4, при котором полипептид TIMP2 характеризуется последовательностью, которая является по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 1.
6. Применение нуклеиновой кислоты, которая усиливает экспрессию TIMP2 полипептида по любому из пп.1 или 2.
7. Применение по любому из предыдущих пунктов, при котором млекопитающее представляет собой примата.
8. Применение по п.7, при котором примат представляет собой человека.
9. Применение по п.7 или 8, при котором возраст примата старше 50 лет.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2