

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-532004
(P2017-532004A)

(43) 公表日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 6 4
C 07 K 14/81 (2006.01)	C 07 K 14/81		4 B 0 6 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 C 0 7 6
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 C 0 8 4
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10		4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-503857 (P2017-503857)	(71) 出願人	500049716 アムジエン・インコーポレーテッド アメリカ合衆国 シーエー 91320, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成27年8月26日 (2015. 8. 26)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月23日 (2017. 1. 23)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/046992	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開番号	W02016/033212	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成28年3月3日 (2016. 3. 3)	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(31) 優先権主張番号	62/042,574		
(32) 優先日	平成26年8月27日 (2014. 8. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

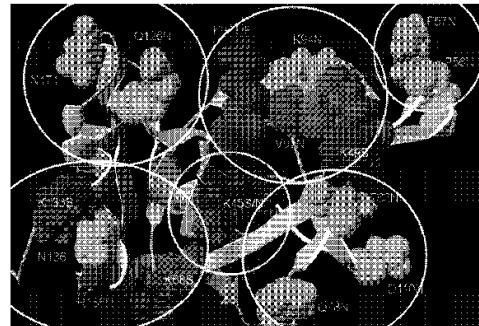
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組織メタロプロテイナーゼ阻害物質3型 (T I M P - 3) の変異体、組成物、及び方法

(57) 【要約】

本出願は、組織メタロプロテイナーゼ阻害物質3 (T I M P - 3) ムテイン、変異体、及び誘導体、それらをコードする核酸、ならびにそれらの作製方法及び使用方法に関する、詳細には、N結合型グリコシリ化部位を導入する目的で、特定のアミノ酸置換を持つT I M P - 3 ムテインに関する。

【選択図】図9



【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2に記載のTIMP-3の成熟領域とアミノ酸配列が少なくとも90%同一である成熟領域を有する孤立したTIMP-3ムテインであって、以下：

- a) K45N / V47T ; K50N / V52T ; P56N / G58T ; H78N / Q80T ; K94N / E96T ; 及び D110N / K112T からなる群より選択される1種または複数の変異の対を有するTIMP-3ムテイン；
- b) K45N / V47T ; K50N / V52T ; P56N / G58T ; H78N / Q80T ; K94N / E96T ; 及び D110N / K112T からなる群より選択される1種または複数の変異の対を有し；かつ R138T ; G173T、ならびに R138T 及び G173T の両方からなる群より選択される追加の変異を有するTIMP-3ムテイン；及び

c) さらに変異 F57N を有する a) または b) に記載の TIMP-3ムテイン からなる群より選択される、前記 TIMP-3ムテイン。

【請求項2】

配列番号2の第24-211番アミノ酸とアミノ酸配列が少なくとも90%同一である成熟領域を有するTIMP-3ムテインであって、以下：

- a) K45N / V47T ; K50N / V52T ; P56N / G58T ; H78N / Q80T ; K94N / E96T ; 及び D110N / K112T からなる群より選択される1種または複数の変異の対を有するTIMP-3ムテイン；
 - b) K45N / V47T ; K50N / V52T ; P56N / G58T ; H78N / Q80T ; K94N / E96T ; 及び D110N / K112T からなる群より選択される1種または複数の変異の対を有し；かつ R138T ; G173T、ならびに R138T 及び G173T の両方からなる群より選択される追加の変異を有するTIMP-3ムテイン；及び
- c) さらに変異 F57N を有する a) または b) に記載の TIMP-3ムテイン からなる群より選択される、前記 TIMP-3ムテイン。

【請求項3】

変異は、K45N、V47T、P56N、G58T、Q126N、R138T ; K45N、V47T、P56N、G58T、K94N、E96T、R138T ; K45N、V47T、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T5 ; K45N、V47T、F57N、K94N、E96T、R138T ; K45N、V47T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T ; K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T5 ; K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T ; K45N、V47T、K94N、E96T、R138T、G173T ; K45S、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; K45S、F57N、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T ; K50N、V52T、P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; K50N、V52T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T ; K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T ; K50N、V52T、Q126N、R138T、G173T ; P56N、G58T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T ; P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T ; K50N、V52T、Q126N、R138T、G173T ; P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; P56N、G58T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T ; P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T ; P56N、G58T、Q126N、R138T、G173T ; H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T ; H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T ; H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T ; K50N / V52

10

20

30

40

50

T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、D 1 1 0
 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2
 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / A
 8 0 T、R 1 3 8 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2
 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ;
 K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N
 / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T ; K 4 5 N / V
 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T ; K 5 0 N
 / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7
 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、
 D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7
 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N
 / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5
 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V
 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N
 / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4
 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3
 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、
 G 1 7 3 T ; 及び K 4 5 N / V 5 2 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1
 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載
 の T I M P - 3 ムテイン。 10 20

【請求項 4】

以下 :

- a . K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T (配列番号
 3) ;
- b . K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T (配列番号 4) ;
- c . K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号
 5) ;
- d . K 4 5 N、V 4 7 T、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T
 (配列番号 6) ; 30
- e . K 4 5 N、V 4 7 T、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T (配列番号 7) ;
- f . K 4 5 N、V 4 7 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、
 G 1 7 3 T (配列番号 8) ;
- g . K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
 T (配列番号 9) ;
- h . K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、G 1 7 3
 T (配列番号 10) ;
- i . K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号
 11) ; 40
- j . K 4 5 S、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
 T (配列番号 12) ;
- k . K 4 5 S、F 5 7 N、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T (配列番号 13) ;
- l . K 5 0 N、V 5 2 T、P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、
 K 1 1 2 T、R 1 3 8 T (配列番号 14) ;
- m . K 5 0 N、V 5 2 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、
 G 1 7 3 T (配列番号 15) ;
- n . K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
 50

T (配列番号 16) ;
o . K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
T、G 1 7 3 T (配列番号 17) ;
p . K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号
18) ;
q . K 5 0 N、V 5 2 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号 19) ;
r . P 5 6 N、G 5 8 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T (配列番号
20) ;
s . P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T (配列番号
21) ;
t . P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
T (配列番号 22) ;
u . P 5 6 N、G 5 8 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、G 1 7 3 T (配列番号
23) ;
v . P 5 6 N、G 5 8 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号 24) ;
w . H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号
25) 及び
x . H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8
T (配列番号 26) ;

からなる群より選択される、請求項 3 に記載の T I M P - 3 ムテイン。

10

20

30

40

50

【請求項 5】

ポリペプチドの半減期を延長する部分と融合または結合した、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の T I M P - 3 ムテイン。

【請求項 6】

抗体、抗体の F c 部分、抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはヒト血清アルブミンと融合した、請求項 5 に記載の T I M P - 3 ムテイン。

【請求項 7】

ポリエチレングリコールと結合した、請求項 5 に記載の T I M P - 3 ムテイン。

【請求項 8】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の T I M P - 3 ムテインをコードする、孤立した核酸。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の孤立した核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の発現ベクターで形質転換したまたは形質移入した、孤立した宿主細胞。

【請求項 11】

組換え T I M P - 3 ムテインの產生方法であって、請求項 10 に記載の形質転換したまたは形質移入した宿主細胞を、前記 T I M P - 3 ムテインの発現を促進する条件下で培養すること、及び前記 T I M P - 3 ムテインを回収することを含む、前記方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の T I M P - 3 ムテイン、及び生理学的に許容される希釈剤、賦形剤、またはキャリアを含む、組成物。

【請求項 13】

マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 及び / または T I M P - 3 により阻害されるまたは阻害される可能性がある他のプロテイナーゼが原因または増悪役割を果たす症状の治療方法であって、そのような症状を患っている個体に、該症状を治療するのに十分な量の請求項 12 に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 14】

前記症状は、炎症性症状、変形性関節症、心筋虚血、再灌流傷害、及びうっ血性心

不全への進行からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記症状は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、及び特発性肺線維症（IPF）、炎症性腸疾患、乾癬、心筋炎、粥状動脈硬化に関連した炎症、及び関節炎症状からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記症状は、リウマチ様関節炎及び乾癬性関節炎、ウイルス性心筋炎、栄養障害型表皮水疱症、変形性関節症、偽痛風、リウマチ様関節炎、若年性リウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、歯周病、潰瘍化、術後創傷治癒、再狭窄、肺気腫、骨パジェット病、骨粗鬆症、強皮症、褥瘡で起こるものなどの骨または組織の圧迫萎縮、真珠腫、異常創傷治癒、小関節型リウマチ様関節炎、多関節型リウマチ様関節炎、全身型リウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、腸炎性関節炎、反応性関節炎、SEA症候群（血清陰性、腱付着部症、関節症症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、強皮症、全身性紅斑性狼瘡、血管炎、筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、変形性関節症、結節性多発性動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、類肉腫症、硬化症、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆位乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、粥状動脈硬化、狼瘡、スチル病、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、重症筋無力症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリック病（非熱帶性スブルー）、血清反応陰性関節症に関連した腸疾患、顕微鏡的またはコラーゲン性大腸炎、好酸球性胃腸炎、直腸結腸切除術及び回腸肛門吻合術後に生じる囊炎、膀胱炎、インシュリン依存性真性糖尿病、乳腺炎、胆囊炎、胆管炎、胆管周囲炎、多発性硬化症（MS）、喘息、外因性喘息、内因性喘息、気道の反応性亢進、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性気管支炎、肺気腫、急性呼吸障害症候群（ARDS）、呼吸促迫症候群、囊胞性線維症、肺高血圧症、肺血管狭窄、急性肺損傷、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性肺炎、気管支炎、アレルギー性気管支炎気管支拡張症、結核、過敏性肺炎、職業性喘息、喘息様障害、サルコイド、反応性気道疾患（または機能障害性）症候群、綿肺症、間質性肺疾患、好酸球増加症候群、鼻炎、副鼻腔炎、及び肺寄生虫症、ウイルス誘導型症状に関連した気道過敏症、ギラン・バレー病、グレーブス病、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、移植片対宿主病（GVHD）、脳虚血、外傷性脳損傷、多発性硬化症、ニューロパチー、ミオパチー、脊椎損傷、ならびに筋萎縮性側索硬化症（ALS）からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記症状は、血管プラーク安定化、脈管障害、新生内膜形成、急性肺損傷、及び急性呼吸促迫症候群からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

対象における心臓細胞外基質（ECM）分解または有害な心臓リモデリングの阻害方法であって、前記方法を必要としている対象に、請求項 1 2 に記載の組成物を、ECM分解及び／または有害な心臓リモデリングを阻害するのに有効な量で投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 9】

前記対象は、心筋梗塞を患っている、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記組成物は、冠内投与を介して投与されるか、前記心筋に直接注射される、請求項 1 8 または請求項 1 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照及び参照による援用

本出願は、2014年8月27日出願の62/042,574の優先権の利益を主張し

10

20

30

40

50

、これは、本明細書により参照として援用される。

【0002】

参考によりそのまま全体が援用されるものとして、本明細書と同時に提出されるコンピューターで読み出し可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表があり、この配列表は以下のとおり特定される：A S C I I テキストファイル、ファイル名「49907_SeqList.ing.txt」、154、284バイト、作成日2015年8月10日。

【0003】

発明の分野

本発明は、概して、メタロプロテイナーゼ阻害物質に関する。詳細には、本発明は、組織メタロプロテイナーゼ阻害物質3（「TIMP-3」）、ならびにその新規で有用な、変異体、ムテイン、及び誘導体に関する。

10

【背景技術】

【0004】

結合組織及び関節軟骨は、細胞外基質の合成及び分解という相反する作用により動的平衡状態に維持されている。基質の分解は、マトリクスメタロプロテイナーゼ（MMP）及びトロンボスポンジンモチーフを持つディスインテグリンメタロプロテイナーゼ（ADAMTS）をはじめとするメタロプロテイナーゼの酵素作用により主にもたらされる。こうした酵素は、多くの自然過程（発生、形態形成、骨リモデリング、創傷治癒、及び血管新生などが挙げられる）において重要なものの、こうした酵素のレベル上昇を招く調節不全は、リウマチ様関節炎及び変形性関節症をはじめとする結合組織の分解性疾患において、ならびに癌及び心血管系症状において、有害な役割を果たすと考えられる。

20

【0005】

メタロプロテイナーゼの内因性阻害物質として、プラズマアルファ2-マクログロブリン及び組織メタロプロテイナーゼ阻害物質（TIMP）が挙げられ、それらのうち4種はヒトゲノムにコードされていることが既知である。TIMP-3は、主要な軟骨分解メタロプロテアーゼ全てを阻害し、複数の系列の証拠が、TIMP-3は軟骨を保護することを示している。変形性関節症のラット内側半月板断裂モデルにおいて、軟骨外植片にタンパク質を添加すると、サイトカイン誘導型分解が防止され、関節内注射は、軟骨損傷を減少させる。

30

【0006】

MMPの調節不全はまた、うっ血性心不全でも起こり、多数の炎症誘発性過程において役割を果たすと考えられている。しかしながら、MMP活性を持つ治療用阻害剤としてのTIMP-3の開発は、遺伝子組換えタンパク質の产生及び組換え型TIMP-3の短い半減期という試練により阻まれてきた。詳細には、ラットに静脈内投与した後のTIMP-3の血清半減期は、60分未満であり、そのように短い滞留時間は、疾患部位で治療上有用な濃度を維持する能力に悪影響を及ぼす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、產生、精製、及び薬物動態／薬力学に望ましい性質を示す型のTIMP-3が、当該分野で必要とされている。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、有利な性質、例えば、向上した薬物動態または薬力学的性質（半減期など）、天然型TIMP-3と比較して改善された発現レベル、標的以外（例えば、スカベンジャー受容体）に対して低下した親和性、及び／または產生のためのヘパリン依存性の低下を有するTIMP-3ポリペプチドを提供する。

【0009】

いくつかの実施形態において、本発明は、1つまたは複数の半減期延長部分と融合した、または1つまたは複数の半減期延長部分で化学修飾されたTIMP-3ポリペプチドを

50

提供する。例えば、いくつかの態様において、本発明は、T I M P - 3 の N または C 末端で、孤立した抗体の F c ドメインと融合した T I M P - 3 (またはその断片) を含む、融合タンパク質を提供する。F c ドメインは、F c 部分の N または C 末端を介して T I M P - 3 (またはその断片) と融合してもよい。F c ドメインは、単量体であっても、ヘテロ二量体であってもよい。本発明はまた、ヒト血清アルブミンまたは完全抗体と (重鎖または軽鎖の N または C 末端で) 融合した T I M P - 3 ポリペプチド (またはその断片) も企図している。いくつかの態様において、半減期延長のための T I M P - 3 (またはその断片) の化学修飾として、ポリエチレングリコール (P E G) との結合が含まれる。

【 0 0 1 0 】

ある特定の実施形態において、T I M P - 3 タンパク質は、天然配列に変異を有していて、その結果半減期が改善されており；そのような T I M P - 3 変異は、本明細書中、例えば、「T I M P - 3 ムテイン」と記載される。様々な態様において、T I M P - 3 タンパク質は、配列番号 2 に記載の T I M P - 3 の成熟領域とアミノ酸配列が少なくとも 9 0 % 同一であり、この場合ムテインは、少なくとも 1 つの N 結合型グリコシル化部位を導入する少なくとも 1 つの変異を有する。さらなる実施形態において、T I M P - 3 ムテインは、2 つ、3 つ、または 4 つの新たな N 結合型グリコシル化部位を有する；なおさらなる実施形態において、導入された N 結合型グリコシル化部位の個数は、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 、1 1 、または 1 2 である。各ムテインにおいて、1 つまたは複数の新たな N 結合型グリコシル化部位の付加は、天然分子のメタロプロテイナーゼ阻害活性を実質的に低下させないことが、さらに企図されている。

10

20

30

【 0 0 1 1 】

本発明内において同じく具体化されるのは、配列番号 2 に記載の T I M P - 3 の成熟領域とアミノ酸配列が少なくとも 9 0 % 同一である成熟領域を有し、少なくとも 1 つの変異を有し、その変異は、K 4 5 N 、 V 4 7 T 、 K 5 0 N 、 V 5 2 T 、 P 5 6 N 、 F 5 7 N 、 G 5 8 T 、 H 7 8 N 、 Q 8 0 T 、 K 9 4 N 、 E 9 6 T 、 D 1 1 0 N 、 K 1 1 2 T 、 R 1 3 8 T 、及び G 1 7 3 T からなる群より選択される、T I M P - 3 ムテインである。さらなる実施形態には、K 4 5 N / V 4 7 T 、 K 5 0 N / V 5 2 T 、 P 5 6 N / G 5 8 T 、 H 7 8 N / Q 8 0 T 、 K 9 4 N / E 9 6 T 、及び D 1 1 0 N / K 1 1 2 T からなる群より選択される変異の対を 2 つ以上有する T I M P - 3 ムテイン；ならびに、K 4 5 N / V 4 7 T 、 K 5 0 N / V 5 2 T 、 P 5 6 N / G 5 8 T 、 H 7 8 N / Q 8 0 T 、 K 9 4 N / E 9 6 T 、及び D 1 1 0 N / K 1 1 2 T からなる群より選択される変異の対を 1 つまたは複数有し、さらに R 1 3 8 T 、 G 1 7 3 T 、及び R 1 3 8 T と G 1 7 3 T の両方からなる群より選択される追加の変異を有する T I M P - 3 ムテインが含まれる。さらなる実施形態には、上記の組み合わせの変異のいずれか及びそれに加えて変異 F 5 7 N を有するムテインが含まれる。

40

【 0 0 1 2 】

本発明の 1 つの実施形態において、少なくとも 1 つの N 結合型グリコシル化部位が、以下からなる群より選択される T I M P - 3 アミノ酸配列の領域に導入される：第 4 4 - 5 9 番アミノ酸からなる領域；第 7 7 - 8 1 番アミノ酸からなる領域；第 9 3 - 9 7 番アミノ酸からなる領域；第 1 0 9 - 1 1 2 番アミノ酸からなる領域；第 1 3 7 - 1 3 9 番アミノ酸からなる領域；第 1 7 2 - 1 7 4 番アミノ酸からなる領域；及びそれらの組み合わせ。さらなる実施形態において、T I M P - 3 ムテインは、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの N 結合型グリコシル化部位を有する；なおさらなる実施形態において、導入される N 結合型グリコシル化部位の個数は、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 、1 1 、または 1 2 である。

40

【 0 0 1 3 】

本発明の 1 つの実施形態は、以下の T I M P - 3 ムテインを提供する：K 4 5 N 、 V 4 7 T 、 P 5 6 N 、 G 5 8 T 、 Q 1 2 6 N 、 R 1 3 8 T (配列番号 3) ； K 4 5 N 、 V 4 7 T 、 P 5 6 N 、 G 5 8 T 、 K 9 4 N 、 E 9 6 T 、 R 1 3 8 T (配列番号 4) ； K 4 5 N 、 V 4 7 T 、 P 5 6 N 、 G 5 8 T 、 R 1 3 8 T 、 G 1 7 3 T (配列番号 5) ； K 4 5 N 、 V

50

47T、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T(配列番号6); K45N、V47T、F57N、K94N、E96T、R138T(配列番号7); K45N、V47T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T(配列番号8); K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号9); K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T(配列番号10); K45N、V47T、K94N、E96T、R138T、G173T(配列番号11); K45S、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号12); K45S、F57N、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T(配列番号13); K50N、V52T、P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号14) 10; K50N、V52T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T(配列番号15); K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号16); K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T、G173T(配列番号17); K50N、V52T、K94N、E96T、R138T、G173T(配列番号18); K50N、V52T、Q126N、R138T、G173T(配列番号19); P56N、G58T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T(配列番号20); P56N、G58T、K94N、E96T、Q126N、R138T(配列番号21); P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号22); P56N、G58T、H78N、Q80T、K94N、E96T、G173T(配列番号23); P56N、G58T、Q126N、R138T、G173T(配列番号24); H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T(配列番号25); 及びH78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T(配列番号26)。 20

【0014】

さらなる実施形態には、以下のTIMP-3ムテインが含まれる: K50N/V52T、D110N/K112T、R138T、G173T; K45N/V47T、D110N/K112T、R138T、G173T; H78N/Q80T、D110N/K112T、R138T、G173T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/A80T、R138T; K45N/V47T、H78N/Q80T、D110N/K112T 30、G173T; K45N/V47T、H78N/Q80T、R138T、G173T; K50N/V52T、H78N/Q80T、K94N/E96T、G173T; K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、R138T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T; K50N/V52T、H78N/Q80T、R138T、G173T; K45N/V47T、H78N/Q80T、R138T、G173T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、G173T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、R138T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、G173T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、R138T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、R138T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、R138T; K45N/V47T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、G173T; 及びK45N/V52T、K50N/V52T、H78N/Q80T、D110N/K112T、R138T。 40

【0015】

本発明はさらに、配列番号3~26及び51~60に記載のアミノ酸配列を含む(またはそのアミノ酸配列からなる)TIMP-3ムテイン、ならびに配列番号3~26及び51~60のいずれか1つのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供 50

する。

【0016】

1つの態様において、本発明は、上記T I M P - 3 ムテインのいずれか1つに従うT I M P - 3 ムテインをコードする核酸（例えば、孤立した核酸）を提供する。本発明の他の態様は、核酸を含む発現ベクター；発現ベクターで形質転換したまたは形質移入された宿主細胞（例えば、孤立した宿主細胞）；及び遺伝子組換えT I M P - 3 ムテインの産生方法、本方法はT I M P - 3 ムテインの発現を促進する条件下で形質転換または形質移入細胞を培養すること、及びT I M P - 3 ムテインを回収することを含む、である。

【0017】

本発明はまた、配列番号27～50及び61～70に記載の核酸配列を含む（またはその核酸配列からなる）核酸を提供する。10

【0018】

さらに提供されるのは、本明細書中記載されるT I M P - 3 ムテインを含む組成物、ならびにマトリクスマタロプロテアーゼ（MMP）及び／またはT I M P - 3 により阻害されるまたは阻害される可能性がある他のプロティナーゼが原因または増悪役割を果たす症状を治療する方法であり、本方法は、そのような症状を患っている個体に、そのような症状を治療するのに十分な量のそのような組成物を投与することを含む。

【0019】

1つの実施形態において、症状は、炎症性症状、変形性関節症、急性心筋梗塞、心虚血（心筋虚血を含む）、再灌流傷害、及び慢性心不全（例えば、うっ血性心不全）への進行からなる群より選択される。様々な態様において、症状は、血管プラーク安定化、脈管障害、または新生内膜形成である。別の実施形態において、症状は、急性肺損傷、急性呼吸促迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、ならびに特発性肺線維症（IPF）、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、及びセリック病）、乾癬、ウイルス性心筋炎を含む心筋炎、粥状動脈硬化に関連した炎症、ならびにリウマチ様関節炎及び乾癬性関節炎を含む関節炎症状からなる群より選択される。20

【0020】

さらなる実施形態において、症状は以下からなる群より選択される：栄養障害型表皮水疱症、変形性関節症、偽痛風、若年性リウマチ様関節炎を含むリウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、強皮症、歯周病、角膜の、表皮の、または胃の潰瘍化を含む潰瘍化、術後創傷治癒、再狭窄、肺気腫、骨パジェット病、骨粗鬆症、強皮症、褥瘡で起こるものなどの骨または組織の圧迫萎縮、真珠腫、異常創傷治癒、リウマチ様関節炎、小関節型リウマチ様関節炎、多関節型リウマチ様関節炎、全身型リウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、腸炎性関節炎、反応性関節炎、SEA症候群（血清陰性、腱付着部症、関節症症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、強皮症、全身性紅斑性狼瘡、血管炎、筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、変形性関節症、結節性多発性動脈炎、ウェグナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、類肉腫症、硬化症、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆位乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、粥状動脈硬化、狼瘡、スチル病、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、重症筋無力症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリック病（非熱帯性スブルー）、血清反応陰性関節症に関連した腸疾患、顕微鏡的またはコラーゲン性大腸炎、好酸球性胃腸炎、または直腸結腸切除術及び回腸肛門吻合術後に生じる囊炎、脾炎、インシュリン依存性真性糖尿病、乳腺炎、胆囊炎、胆管炎、胆管周囲炎、多発性硬化症（MS）、喘息（外因性及び内因性喘息ならびに気道の関連慢性炎症性症状、または反応性亢進を含む）、慢性閉塞性肺疾患（COPD、すなわち、慢性気管支炎、肺気腫）、急性呼吸障害症候群（ARDS）、呼吸促迫症候群、囊胞性線維症、肺高血圧症、肺血管狭窄、急性肺損傷、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性肺炎、気管支炎、アレルギー性気管支炎気管支拡張症、結核、過敏性肺炎、職業性喘息、喘息様障害、サルコイド、反応性気道疾患（または機能障害）症候群、綿肺症、間質性肺疾患、好酸球増加症候群、鼻炎、副鼻腔炎、及び肺寄生虫症、ウイルス誘導型症状（例えば、呼吸器多角体ウイルス（RSV）304050

、パラインフルエンザウイルス（P I V）、ライノウイルス（R V）、及びアデノウイルス）に関連した気道過敏症、ギラン・バレー病、グレーブス病、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、移植片対宿主病（G V H D）、脳虚血、外傷性脳損傷、多発性硬化症、ニューロパチー、ミオパチー、脊椎損傷、ならびに筋萎縮性側索硬化症（A L S）。

【図面の簡単な説明】

【0 0 2 1】

【図1】様々な量のヘパリンの存在下で產生された、T I M P - 3 融合タンパク質、すなわち抗体のF c部分と融合したN - T I M P - 3 (A A 1 - 1 4 4)（「T I M P - 3 - F c」）の量を示すS D S - P A G E ゲルを再現したものである。レーン# 1 ~ 4は、F c標準物質（「S T D」）を含有していた：レーン# 1は、ヒトF cを1 0 0 n g含有していた；レーン# 2は、ヒトF cを2 5 0 n g含有していた；レーン# 3は、ヒトF cを5 0 0 n g含有していた；及びレーン# 4は、ヒトF cを1 0 0 0 n g含有していた。レーン# 5 ~ 9は、T I M P - 3 - F cを発現するC H O K 1細胞を、ヘパリン不在下（レーン# 5）、5 0 0 m g / Lのヘパリン存在下（レーン# 6）、2 5 0 m g / Lのヘパリン存在下（レーン# 7）、1 0 0 m g / Lのヘパリン存在下（レーン# 8）、または5 0 m g / Lのヘパリン存在下（レーン# 9）で増殖させた培養培地から採取した試料1 0 μ Lを含有していた。

【図2】ヘパリン不在下で產生された、抗体のF c部分と融合したT I M P - 3ムテインの量を示すS D S - P A G E ゲルを再現したものである。レーン# 1 ~ 4は、F c標準物質（「S T D」）を含有していた：レーン# 1は、ヒトF cを1 0 0 n g含有していた；レーン# 2は、ヒトF cを2 5 0 n g含有していた；レーン# 3は、ヒトF cを5 0 0 n g含有していた；及びレーン# 4は、ヒトF cを1 0 0 0 n g含有していた。レーン# 5は、宿主細胞対照試料を表していた。レーン# 6 ~ 9は、T I M P - 3ムテイン - F c : T I M P - 3 [K 4 5 N / V 4 7 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / G 1 7 3 T] - F c G 1融合体（レーン# 6）、T I M P - 3 [K 4 5 N / V 4 7 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / G 1 7 3 T] - I g G 1 F c + E P K S S融合体（レーン# 7）、T I M P - 3 [H 7 8 N / Q 8 0 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / R 1 3 8 T] - F c G 1融合体（レーン# 8）、またはT I M P - 3 [H 7 8 N / Q 8 0 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / R 1 3 8 T] - I g G 1 F c + E P K S S融合体（レーン# 9）を発現するC H O K 1細胞の培養培地から採取した試料1 0 μ Lを含有していた。

【図3】ヘパリンの存在下及び不在下で產生された、ヒト血清アルブミン（H S A）と融合した天然型N - T I M P - 3の量を示すS D S - P A G E ゲルを再現したものである。レーン# 1 ~ 4は、F c標準物質（「S T D」）を含有していた：レーン# 1は、ヒトF cを1 0 0 n g含有していた；レーン# 2は、ヒトF cを2 5 0 n g含有していた；レーン# 3は、ヒトF cを5 0 0 n g含有していた；及びレーン# 4は、ヒトF cを1 0 0 0 n g含有していた。レーン# 5は、宿主細胞対照試料を表していた。レーン# 6 ~ 1 1は、T I M P - 3 - H S Aを発現するC H O K 1の培養培地の異なるプールから採取した試料1 0 μ Lを含有していた：ヘパリンありで培養したプール1（レーン# 6）、ヘパリンありで培養したプール2（レーン# 7）、ヘパリンありで培養したプール3（レーン# 8）、ヘパリンなし（「w o」）で培養したプール1（レーン# 9）、ヘパリンなしで培養したプール2（レーン# 1 0）、ヘパリンなしで培養したプール3（レーン# 1 1）。

【図4】T A C E、R A P、及びL P R - 1と会合したT I M P - 3の三次元構造の図である。2 2位及び1 1 0位のT I M P - 3リシンに目印を付けてある。W i s n i e w s k a et al . , J . M o l . B i o l . , 3 8 1 , 1 3 0 7 - 1 3 1 9 (2 0 0 8)も参照。

【図5】T I M P - 3 [K 4 5 S、F 5 6 N]の薬物動態性質を示す2つの線グラフであり、蛍光面積 / 全面積（%）または蛍光面積 / 全面積（0時点での%）（y軸）対梗塞後の日数（x軸）で比較している。

【図6】T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1

10

20

30

40

50

2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) の薬物動態性質を示す 2 つの線グラフであり、蛍光面積 / 全面積 (%) または蛍光面積 / 全面積 (0 時点での %) (y 軸) 対梗塞後の日数 (x 軸) で比較している。

【図 7】心筋梗塞後、T I M P - 3 ポリペプチドの投与に続いて経時的に観測した (日数、x 軸) 駆出率 (%) (y 軸) を示す線グラフである。三角 = 全長 T I M P - 3 (30 mg) ; 白四角 = T I M P - 3 の N 末端ドメイン (N - T I M P 3) (30 mg) ; 黒四角 = N - T I M P 3 (30 mg) 、丸 = 対照 (生理食塩水)。

【図 8 A】ラットで、心筋梗塞後に、T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) (図中「T I M P 3 v 8 2」と称する) により仲介された、心機能の改善及び心リモデリングの減少を示す棒グラフである。図 8 A は、ビヒクル (左の棒グラフ) または T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (右の棒グラフ) で処置された対象について投与後 3 日目及び 7 日目 (x 軸) に検出された駆出率 (% E F、y 軸) を示す。

【図 8 B】ラットで、心筋梗塞後に、T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) (図中「T I M P 3 v 8 2」と称する) により仲介された、心機能の改善及び心リモデリングの減少を示す棒グラフである。図 8 B は、ビヒクルまたは T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] 投与後 3 日目及び 7 日目 (x 軸) に測定された収縮終期容積 (E S V) (y 軸) を示す。

【図 8 C】ラットで、心筋梗塞後に、T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) (図中「T I M P 3 v 8 2」と称する) により仲介された、心機能の改善及び心リモデリングの減少を示す棒グラフである。図 8 C は、ビヒクルまたは T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] 投与後 3 日目及び 7 日目 (x 軸) に測定された拡張終期容積 (E S V) (y 軸) を示す。

【図 9】様々なアミノ酸の位置を示した T I M P - 3 の三次元構造の図である。

【図 10 A】T I M P - 3 ムテインのアミノ酸配列を提示する。アミノ酸配列に含まれる一連の「X」は、シグナルペプチドの位置を示す (例えば、配列番号 2 の第 1 - 2 3 番アミノ酸)。

【図 10 B】T I M P - 3 ムテインのアミノ酸配列を提示する。アミノ酸配列に含まれる一連の「X」は、シグナルペプチドの位置を示す (例えば、配列番号 2 の第 1 - 2 3 番アミノ酸)。

【図 10 C】T I M P - 3 ムテインのアミノ酸配列を提示する。アミノ酸配列に含まれる一連の「X」は、シグナルペプチドの位置を示す (例えば、配列番号 2 の第 1 - 2 3 番アミノ酸)。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 2】

本発明は、T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインに関連する組成物、キット、及び方法を提供する。同じく提供されるのは、そのような T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を含む核酸ならびにその誘導体及び断片、例えば、そのような T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインの全部または一部をコードする核酸；そのような核酸を含むプラスミド及びベクター、ならびに、そのような核酸及び / またはベクター及びプラスミドを含む細胞または細胞株である。提供される方法は、例えば、望ましい性質を示す T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインを作製し、同定し、または単離する方法を含む。

【0 0 2 3】

哺乳類中に内因性 T I M P - 3 を増大させること、または特定の組織中の T I M P - 3 のレベルを上昇させることが有利であると考えられる状態は多数存在する。したがって、

10

20

30

40

50

同じく本明細書中提供されるのは、T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインを含む医薬組成物などの組成物を作製する方法、ならびにT I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインを含む組成物を、対象、例えば、マトリクスメタロプロテイナーゼ活性の調節不全が過剰または不適切な組織リモデリングをもたらす症状を患った対象に投与する方法、である。

【0024】

本明細書中特に指定がない限り、本発明に関連して用いられる科学技術用語は、当業者に一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって特に要求がない限り、単数形の用語は複数を包含し、複数形の用語は单数を包含するものとする。一般に、本明細書中記載される、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質及び核酸の化学及びハイブリダイゼーションに関連して用いられる術語、及びそれらの技術は、当該分野で周知のものであり、一般的に用いられるものである。本発明の方法及び技術は、特に記載がない限り、概して、当該分野で周知である従来方法に従って、また、本明細書全体を通じて引用及び説明される様々な一般文献及びより専門的な参考文献に記載されるとおりに、行われる。例えば、Sambrook et al . Molecular Cloning: A Laboratory Manual , 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N.Y. (1989) 、及びAusubel et al . , Current Protocols in Molecular Biology , Greene Publishing Associates (1992) 、及びHarlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N.Y. (1990) を参照、これらは、本明細書中参照として援用される。

酵素反応及び精製技術は、製造者の仕様に従って、当該分野で一般的に行われるとおりに、あるいは本明細書中記載されるとおりに行われる。本明細書中記載される、分析化学、有機合成化学、ならびに医薬品化学及び製薬化学に関連して用いられる用語法ならびにそれら実験法及び実験技術は、当該分野で周知なものであり、一般的に用いられるものである。化学合成、化学分析、薬剤調製、配合、及び送達、ならびに患者の治療に、標準的な技術を用いることができる。

【0025】

特に記載がない限り、以下の用語は、当然ながら以下の意味を有するものとする：

【0026】

用語「孤立した」は、分子（例えば、分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体である）を特性決定するために用いられる場合、その分子が、その起源または誘導源のおかげで、（1）天然状態ではその分子に付随する天然関連成分を、付随させていない、（2）同じ種に由来する他の分子を実質的に含まない、（3）異なる種に由来する細胞によって発現される、または（4）ヒトの介在がなければ自然には発生しない、ということを示す。すなわち、分子は、化学合成された場合、またはその分子を天然に発生させる細胞とは異なる細胞系で合成された場合、その天然関連成分から「孤立した」ことになる。分子はまた、当該分野で周知の精製技術を用いて単離することにより、天然関連成分を実質的になくしてもよい。分子の純度または均一性は、当該分野で周知の多数の手段によってアッセイしてもよい。例えば、ポリペプチド試料の純度は、当該分野で周知の技術を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の使用及びゲルの染色でポリペプチドを視覚化してアッセイしてもよい。ある特定の目的のためには、HPLCまたは当該分野で周知の他の精製手段を用いることによって、より高い分解能を得てもよい。様々な実施形態において、本発明は、孤立したT I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテイン；T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインをコードする孤立した核酸；及び、その核酸を含む、あるいはポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテインを产生する発現ベクターを含む、孤立した宿主細胞を提供する。

10

20

30

40

50

【0027】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語はそれぞれ、ペプチド結合によって互いに結合した2つ以上のアミノ酸残基を含む分子を示す。これらの用語は、例えば、天然及び人工のタンパク質、タンパク質断片、ならびにタンパク質配列のポリペプチド類似体（ムテイン、変異体、及び融合タンパク質など）、ならびに翻訳後修飾された、またはいずれにしろ共有結合でもしくは非共有結合で修飾されたタンパク質を包含する。ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は単量体型であっても多量体型であってもよい。

【0028】

「ポリペプチド断片」という用語は、本明細書中使用される場合、対応する全長タンパク質と比べて、アミノ末端欠失及び／またはカルボキシ末端欠失を有するポリペプチドを示す。断片は、例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、70、80、90、100、150、または200アミノ酸長であることが可能である。断片はまた、例えば、最長で1,000、750、500、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、14、13、12、11、または10アミノ酸長までが可能である。断片はさらに、その両端またはどちらか一端に、1つまたは複数の追加アミノ酸、例えば、異なる天然のタンパク質に由来するアミノ酸配列（例えば、Fcまたはロイシンジッパードメイン）または人工アミノ酸配列（例えば、人工リンカー配列またはタグタンパク質）を含むことができる。

10

20

【0029】

ポリペプチドの「変異体」または「ムテイン」（例えば、T I M P - 3 変異体またはムテイン）は、別のポリペプチド配列と比較して、アミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸残基の挿入、欠失、及び／または置換のなされているアミノ酸配列を含む。本発明の変異体は融合タンパク質を含む。当然のことながら、文脈で特に指定されない限り、本明細書中記載される「ポリペプチド」または「タンパク質」の特長は、変異体、ムテイン、及び誘導体にも起因する。

30

【0030】

「保存的アミノ酸置換」は、親配列の構造的特性を実質的に変えないものである（例えば、置換アミノ酸は、親配列で生じるヘリックスを破壊する傾向がないもの、または親配列を特徴づけるかもしれないその機能に必要である他の型の二次構造を破壊する傾向がないものである）。当該分野で認められているポリペプチド二次及び三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))；Introduction to Proteins Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))；及びThornton et al. Nature 354:105 (1991)に記載されており、これらはそれぞれ本明細書中参照として援用される。

40

【0031】

天然タンパク質に対する変異体またはムテインの類似度を示す1つの方法は、2つ（またはそれ以上）のポリペプチド配列間またはそれをコードする核酸配列間の同一性パーセントを比較して示すことによるものである。2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の「同一性パーセント」は、GAPコンピュータープログラム（GCG Wisconsin Package、バージョン10.3（Accelrys, San Diego, CA）の一部）をその初期パラメーターで用いて配列を比較することにより決定する。

【0032】

ポリペプチドの「誘導体」は、化学修飾された、例えば、別の化学部分（例えば、ポリ

50

エチレングリコールまたはアルブミン、例えば、ヒト血清アルブミンなど)との共役結合、リン酸化、及び/またはグリコシル化で修飾されたポリペプチド(例えば、T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、またはムテイン)である。

【0033】

ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列は、標準の1文字または3文字略語を用いて示される。特に記載がない限り、各ポリペプチド配列は、左にアミノ末端を、右にカルボキシ末端を有し；各一本鎖核酸配列、及び各二本鎖核酸配列の上側の鎖は、左に5'末端を、右に3'末端を有する。特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列はまた、それが参照配列とどのように異なるかを説明することによって記載することができる。例えば、アミノ酸の置換は、本明細書中、「n # m」として表され、「n」は天然の全長ポリペプチドに見られるアミノ酸を表し、「#」はアミノ酸残基の番号を表し、「m」は置換されたアミノ酸を表す。

10

【0034】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」という用語は、全体を通して同義に用いられ、これらの用語は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチド類似体を用いて生成されたDNAまたはRNAの類似体(例えば、ペプチド核酸及び非天然ヌクレオチド類似体)、及びそれらのハイブリッドを含む。核酸分子は一本鎖でも二本鎖でも可能である。1つの実施形態において、本発明の核酸分子は、本発明のT I M P - 3 ポリペプチド、断片、変異体、誘導体、またはムテインをコードする隣接オープンリーディングフレームを含む。本明細書中記載されるT I M P - 3 ムテイン、変異体、または誘導体をコードする核酸配列を、配列番号：27～50及び61～70に記載する。配列番号27～50及び61～70のヌクレオチド1～69は、T I M Pシグナル配列を構成する。本発明は、配列番号：27～50及び61～70と、ならびに配列番号27～50及び61～70からヌクレオチド1～69を欠失させたヌクレオチド配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一または100%同一)であるヌクレオチド配列を含む核酸を含む。

20

【0035】

2つの一本鎖ポリヌクレオチドは、ギャップの導入もなく、どちらかの配列の5'または3'末端に不対ヌクレオチドを生じることもなく、一方のポリヌクレオチドの各ヌクレオチドが他方のポリヌクレオチドのその相補的ヌクレオチドと相対するように、それらの配列を逆平行向きに整列させることができる場合に、互いに「補完するもの」である。あるポリヌクレオチドと別のポリヌクレオチドの2つが中程度にストリンジメントな条件下でお互いにハイブリダイズできる場合に、あるポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドに対して「相補的」である。したがって、ポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドに対して、それが補完する相手でなくとも、相補的であり得る。

30

【0036】

「ベクター」は、それに結合させた別の核酸を細胞に導入するのに用いることができる核酸である。ベクターの一一種が「プラスミド」であり、プラスミドは、追加の核酸セグメントをその中に連結することができる直鎖状または環状の二本鎖DNA分子を示す。別の種類のベクターとしては、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)があり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに導入できる。ある特定のベクターは、そのベクターが導入された宿主細胞中で自己複製することができる(例えば、細菌の複製起点を含む細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞に導入されるとその宿主細胞のゲノムに組みこまれ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。「発現ベクター」は、選択したポリヌクレオチドの発現を司ることのできるベクターの一種である。

40

【0037】

ヌクレオチド配列は、制御配列がそのヌクレオチド配列の発現(例えば、発現のレベル、タイミング、位置)に影響する場合、その制御配列と「動作可能に連結され」ている。

50

「制御配列」は、その制御配列が動作可能に連結された核酸の発現（例えば、発現のレベル、タイミング、位置）に影響する核酸である。制御配列は、例えば、自身の効果を、制御される核酸に直接及ぼすか、または1つまたは複数の他の分子（例えば、制御配列及び／または核酸と結合する、ポリペプチド）の作用を介して及ぼすことができる。制御配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御要素（例えば、ポリアデニル化信号）が挙げられる。制御配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA and Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06に記載される。

10

【0038】

天然の細胞外タンパク質は、典型的には、「シグナル配列」を含み、シグナル配列は、タンパク質を細胞経路に送り込んでタンパク質が分泌されるように司るが、成熟タンパク質には存在しない。シグナル配列はまた、「シグナルペプチド」または「リーダーペプチド」とも称される場合があり、細胞外タンパク質から酵素により切断される。そのように処理された（即ち、シグナル配列を除去された）タンパク質は、「成熟」タンパク質と称されることが多い。本発明のタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然のシグナル配列をコードしても異種シグナル配列をコードしてもよく、それらの多くは当該分野で既知である。

20

【0039】

当業者には当然のことながら、本実施形態による遺伝子組換えタンパク質またはポリペプチドは、哺乳類細胞株をはじめとする細胞株で発現させることができる。特定のタンパク質をコードする配列を、適切な哺乳類宿主細胞の形質転換に用いることができる。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する任意の既知の方法により行うことができ、そのような方法として、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス（または、ウイルスベクター）の中に包み込んでウイルス（またはベクター）で宿主細胞に形質導入を行うこと、または当該分野で既知の遺伝子導入手順により形質導入することが挙げられ、当該分野で既知の遺伝子導入手順は、米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、及び同第4,959,455号（これらの特許は、本明細書によって、参照により本明細書に援用される）に例示されるとおりである。用いられる形質転換手順は、形質転換しようとする宿主に依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳類細胞に導入する方法は、当該分野で周知であり、そのような方法として、デキストランを介した形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンを介した形質移入、プロトプラスト融合、電気穿孔法、リポソーム中へのポリヌクレオチドの封入、及び核へのDNAの直接微量注入が挙げられる。

30

【0040】

「宿主細胞」は、核酸、例えば、本発明の核酸を発現するのに用いることのできる細胞である。宿主細胞は、原核生物、例えば、E.コリ（*E. coli*）も可能であるし、真核生物、例えば、単細胞の真核生物（例えば、酵母菌または他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコまたはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞）、またはハイブリドーマも可能である。宿主細胞の例として、サル腎臓細胞のCOS-7株（ATCC CRL 1651）（Gluzman et al., 1981, Cell 23:175を参照）、L細胞、C127細胞、3T3細胞（ATCC CCL 163）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはVeggie CHOなどその誘導体、及び無血清培地で増殖する関連細胞株（Rasmussen et al., 1998, Cytotecnology 28:31を参照）、またはDHFRが欠失したCHO株DX-B11（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20を参照）、HeLa細胞、BHK（ATCC CRL 10）細胞株、アフリカミドリザル腎臓細胞株CV1（ATCC CCL 70

40

50

)に由来するCV1/EBNA細胞株(McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821を参照)、293、293EBNA、またはMSR293などのヒト胚性腎臓細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換した靈長類細胞株、正常2倍体細胞、一次組織のin vitro培養に由来する細胞菌株、一次外植片、HL-60、U937、HaK、またはジャーカット細胞が挙げられる。

【0041】

典型的には、宿主細胞は、ポリペプチドをコードする核酸で形質転換または形質移入され得る培養細胞であり、次いでその核酸が宿主細胞で発現され得る。「一過性形質移入」では、核酸は、当該分野で既知の複数の方法の1つによって宿主細胞に導入され、遺伝子組換えタンパク質は、有限期間の間、典型的には約4日間までの間、核酸が消失または分解される前に、例えば、宿主細胞が有糸分裂するときに発現する。「安定形質移入」が望まれる場合、ポリペプチドをコードする核酸は、選択可能なマーカーをコードする核酸とともに宿主細胞に導入されてもよい。選択可能なマーカーの使用により、当業者は、ポリペプチドをコードする核酸が有糸分裂の間もずっと維持されて子孫細胞によって発現され得るような形で、ポリペプチドをコードする核酸が宿主細胞ゲノムの中に組み込まれた形質移入宿主細胞を選択することができる。

10

【0042】

「遺伝子組換え宿主細胞」という語句は、発現させようとする核酸で形質転換または形質移入された宿主細胞を表すのに用いることができる。宿主細胞はまた、核酸を含むが、しかし、制御配列が宿主細胞に導入されてその核酸と動作可能に連結されているようにならない限り、その核酸を所望のレベルで発現しない細胞であることも可能である。当然のことながら、宿主細胞という用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫も示す。後継世代には、例えば、突然変異または環境の影響による何らかの変異が起こる可能性があるため、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一でない場合があるが、それでも本明細書中使用されるとおりの用語の範囲に含まれる。

20

【0043】

本明細書中使用される場合、「TIMP-3DNA」、「TIMP-3をコードするDNA」などは、TIMP-3をコードする選択された核酸を示し、その核酸から発現するTIMP-3は、天然TIMP-3であっても、本明細書中記載されるとおりの、TIMP-3変異体もしくはムテインのいずれかであってもよい。同様に、「TIMP-3」、「TIMP-3タンパク質」、及び「TIMP-3ポリペプチド」は、天然TIMP-3タンパク質、または、1つもしくは複数の変異を含むTIMP-3タンパク質(すなわち、TIMP-3ポリペプチド、変異体、誘導体、またはムテイン)のいずれかを表すために用いられる。TIMP-3の特定のムテインは、1つまたは複数の変異によって表してもよく、例えば、「K45N」または「K45N TIMP-3」または「TIMP-3 K45N」または「K45N TIMP-3ポリペプチド」は、天然型TIMP-3の第45番アミノ酸であるリジン(K)がアスパラギン(N)で置換されたポリペプチドを示す。

30

【0044】

「天然型TIMP-3」という用語は、本明細書中使用される場合、野生型TIMP-3を示す。TIMP-3は哺乳類の様々な細胞または組織によって発現され、細胞外基質に存在する;そのように発現したTIMP-3は、本明細書中、「内因性」TIMP-3とも称される。TIMP-3のアミノ酸配列、及びTIMP-3をコードするDNAの核酸配列は、2003年5月13日発行の米国特許第6,562,596号に開示されており、この開示は本明細書中に参照として援用される。米国特許第6,562,596号で用いられるアミノ酸番号方式は、シグナル(またはリーダー)ペプチドのアミノ酸を負数で表しており、成熟タンパク質(即ち、シグナルまたはリーダーペプチドを除去したタンパク質)を第1-188番アミノ酸と表している。本明細書中使用される番号方式は、TIMP-3を、天然リーダーペプチドの1番目のアミノ酸を#1と指定して示し、したが

40

50

つて、全長 T I M P - 3 は、第 1 - 2 1 1 番アミノ酸を含み、成熟型は第 2 4 - 2 1 1 番アミノ酸を含む。当業者なら、これら異なる番号方式の使用によって起こり得るアミノ酸番号の相違を容易に理解し、したがって、本明細書中使用される番号方式を、例えば、成熟型の 1 番目のアミノ酸を # 1 と称する T I M P - 3 ポリペプチドに容易に適用できる。すなわち、例えば、本明細書中で指定される場合の K 4 5 N は、米国特許第 6 , 5 6 2 , 5 9 6 号の番号方式を用いれば K 2 2 N で指定される。

【 0 0 4 5 】

T I M P - 3 は 2 つのドメイン、即ち、T I M P - 3 の第 2 4 - 1 4 3 番アミノ酸（即ち、分子の約 3 分の 2 ）を含む N 末端ドメイン、及び第 1 4 4 - 2 1 1 番アミノ酸を含む C 末端ドメイン、から形成される。T I M P - 3 は複雑なジスルフィド結合を示し、この結合は、T I M P - 3 の二次及び三次構造の形成を促進する。T I M P - 3 の N 末端ドメインは、「N - T I M P - 3」と称されることが多いが、このドメインは、T I M P - 3 の生物活性の少なくともいくつかを示すことが分かっている；したがって、本明細書中記載されるとおりの T I M P - 3 変異体、誘導体、及びムテインは、N 末端ドメインを含む T I M P - 3 断片の、変異体、誘導体、及びムテインを包含する。
10

【 0 0 4 6 】

天然型 T I M P - 3 タンパク質は、治療用分子として用いるにはいくつかの難題が生じる。例えば、標準的な哺乳類発現技術を使用した場合の T I M P - 3 タンパク質の哺乳動物発現力価は低過ぎるために、治療タンパク質に適切な規模で十分な量の T I M P - 3 を產生させることができない。さらに、T I M P - 3 が細胞外基質と結合することから、細胞培養地にヘパリン（または、T I M P - 3 と細胞外基質の結合を低減させる類似作用剤）を含ませることが必要となり、また、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (L R P 1) スカベンジャータンパク質と結合することから、製造規模のプロセスの開発を可能とするようなレベルで組換え T I M P - 3 を培地に分泌させるという難題がさらに困難になる。全長 T I M P - 3 の原核生物細胞での微生物產生は、タンパク質の不正確なフォールディングにより困難であることが判明した。
20

【 0 0 4 7 】

したがって、これらの難題の 1 つまたは複数を克服するために、本発明の T I M P - 3 変異体またはムテインは修飾されている。本発明のポリペプチドには、何らかの理由により何らかの方法で、例えば、(1) タンパク質加水分解の受けやすさを低減するように、(2) 酸化の受けやすさを低減するように、(3) 細胞培養で T I M P - 3 と細胞外基質の結合を阻害する作用剤に対する必要性を低減するように、(4) 他の部分、例えば、L R P - 1 などのスカベンジャー受容体に対する結合親和性を変化させるように、(5) 薬物動態学及び / または薬力学性質をはじめとする他の物理化学的または機能的性質を与えるか改変するように、あるいは(6) 組換えタンパク質の発現及び / または精製を促進するように、修飾されたポリペプチドが含まれる。類似体として、ポリペプチドのムテインが含まれる。例えば、単独または複数のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）を、天然の配列に（例えば、ポリペプチドの、分子間接触を形成するドメインの外側の部分で）行ってもよい。共通配列を用いて、置換用のアミノ酸残基を選択することができ、当業者には当然ながら、さらなるアミノ酸残基の置換もしてよい。
30

【 0 0 4 8 】

本発明の 1 つの態様において、天然型 T I M P - 3 で観察されるものより上昇した T I M P - 3 ムテインまたは変異体の発現レベルを示す T I M P - 3 ムテインまたは変異体が提供される；本発明の別の態様において、発現の増加は哺乳類細胞発現系で起こる。発現レベルは、細胞培養上清液、即ち、馴化培地 (C M) において組換え T I M P - 3 (天然型、変異体、またはムテイン) の量の定量的または半定量的分析を可能とする適切な方法であれば、どのような方法で決定してもよい。1 つの実施形態において、試料または C M は、ウエスタンブロットによって評価される；別の実施形態において、C M 試料は標準ヒト T I M P - 3 E L I S A によって評価される。
40

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、発現の増加は一過性発現系で観察される；別の実施形態において、発現の増加は安定形質移入系で観察される。1つの実施形態は、天然型T I M P - 3に対して観察されるものの2倍（2×）に増加した発現が観測されるT I M P - 3ムテインまたは変異体を提供する；別の実施形態は、天然型T I M P - 3に対して観察されるものの5倍（5×）に増加した発現が観測されるT I M P - 3ムテインまたは変異体を提供する。さらなる実施形態には、発現の増加が3倍（3×）、4倍（4×）、または6倍（6×）であるT I M P - 3ムテインまたは変異体が含まれる。1つの実施形態において、T I M P - 3ムテインまたは変異体の発現は、天然型T I M P - 3で観察されるものの10倍（10×）である；別の実施形態において、観察される発現は、天然型T I M P - 3で観察されるものの10倍超、例えば、20倍（20×）以上である。

10

【0050】

本発明の別の態様において、細胞培養培地にヘパリン（または、T I M P - 3と細胞外基質の結合を阻害する別の作用剤）を添加する必要性が低下したこと（すなわちヘパリン非依存性）を示すT I M P - 3ムテイン（または変異体）が提供される。ヘパリン（または他の作用剤）の量の低減は、半定量的に記載してもよい、即ち、低減は、部分的、中程度、実質的、または完全であるとしてもよい。別の実施形態において、低減はパーセンテージで表現され、例えば、ヘパリン（または類似作用剤）の量は、10%、20%、30%、40%、50%、またはそれ以上（例えば、60%、70%、80%、90%、または100%）低減される場合がある。少なくともある程度のヘパリン非依存性を持つT I M P - 3ムテインの例として、H S Aと融合したT I M P - 3 K 4 5 S、F 5 7 N；T I M P - 3 K 4 5 N / V 4 7 T、P 5 6 N / G 5 8 T、K 9 4 N / E 9 6 T、R 1 3 8 T（配列番号4）；T I M P - 3 K 4 5 N / V 4 7 T、K 9 4 N / E 9 6 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、G 1 7 3 T（配列番号9）；T I M P - 3 H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号26）；及びH S Aと融合したT I M P - 3 H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9 4 N / E 9 6 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号26）が挙げられるが、これらに限定されない。H S Aと融合したN - T I M P - 3は、ヘパリンの使用レベルを低下させて產生させることができる。1つの実施形態において、グリコシル化部位が挿入されたT I M P - 3変異体またはムテインが提供される。当分野で既知のとおり、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列（例えば、以下で説明される、特定のグリコシル化アミノ酸残基の有無）、またはタンパク質を產生する宿主細胞もしくは生体の両方に左右され得る。具体的な発現系は以下で説明される。グリコシル化の有無または程度は、当業者に既知の任意の方法により決定してもよく、そのような方法として、ウエスタンプロット法によって観察されるまたはクーマシー染色S D S - P A G E ゲルから得られる分子量（M W）の移動の半定性的測定方法が挙げられ、一方、定量的測定方法として、質量分光光度計技術を利用したアスパラギン結合グリコシル化の追加に相当するM W移動の観察、または、ペプチド - N - グリコシダーゼF（P N G a s e - F；S i g m a A l d r i c h、S t . L o u i s、M O）などの酵素によるアスパラギン結合グリコシル化の除去に伴う質量変化の観察を通じてのものが挙げられる。

20

【0051】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の付加を示す。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリン（N X S）及びアスパラギン - X - スレオニン（N X T）でXがプロリン以外のいずれかのアミノ酸であるものは、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的付加のための認識配列である。すなわち、ポリペプチド中にこれらトリペプチド配列のいずれかが存在すると、グリコシル化可能部位ができる。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの、糖であるN - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つの付加を示すが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリジンも使われる場合がある。

30

【0052】

40

50

タンパク質（例えば、T I M P - 3）へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が上述のトリペプチド配列の1つ以上を含有するように（N結合型グリコシル化部位の場合）そのアミノ酸配列を改変することによって、都合よく達成される。改変はまた、開始配列への1つまたは複数のセリンまたはスレオニン残基の付加またはそれによる置換によって行ってもよい（O結合型グリコシル化部位の場合）。簡単にするために、タンパク質アミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルでの変化を通じて改変され、特に、所望のアミノ酸へと翻訳されるコドンが生成されるように、標的ポリペプチドをコードするDNAを、あらかじめ選択された塩基において変異させることによって改変される。

【0053】

したがって、N結合型グリコシル化部位は、単独のアミノ酸に対するコドンを改変することによって付加してもよい。例えば、N-X-z（式中、zはいずれのアミノ酸であってもよい）をコードするコドンを、N-X-T（またはN-X-S）をコードするように改変することができ、あるいは、y-X-T/Sをコードするコドンを、N-X-T/Sをコードするように改変することができる。あるいは、2つのアミノ酸をコードするコドンを、同時に改変して、N結合型グリコシル化部位を導入することができる（例えば、y-X-zに対するコドンを、N-X-T/Sをコードするように改変することができる）。このようにして、1~12のN結合型グリコシル化部位を挿入することができる。グリコシル化の挿入は、発現の改善にも有用である場合がある（例えば、Enhancing the Secretion of Recombinant Proteins by Engineering N-Glycosylation Sites. Liu Y. et al., Amer Inst Chem Eng 2009, pg. 1468を参照）。

10

20

30

40

【0054】

T I M P - 3にN結合型グリコシル化部位を挿入する他に、天然型T I M P - 3に存在する任意のグリコシル化部位を、例えば、分子の構造を安定化させるために、修飾することができる。すなわち、例えば、残基208位のAを、Y、V、またはGなどの異なる残基で置換してもよい。残基206~208位の「N-X-T」部位でのさらなる修飾として、残基208位での上述の置換の1つと組み合わせて、残基205位でIをFに置換すること、または残基205でIをYに置換すること、が挙げられる。

【0055】

すなわち、別の実施形態において、コンピューター分析によって明らかにした溶媒接触部位のサブセットをふるいにかけて、N-グリコシル化の見込みを調べる。グリコシル化部位の挿入が関与する方法の場合、例えば、古典的N-X-Tグリコシル化部位（Nはアスパラギンであり、Xはいずれかのアミノ酸であり、Tはスレオニンである）を形成するように変異させ得る残基を同定することによって、N結合型グリコシル化の可能性を支援するように変異させ得る部位を選択するのに、N-グリコシル化予測ツールが有用である。さらなる実施形態において、構造に基づく方法を用いて、溶媒に接触するアミノ酸（側鎖への接触が>20²であるアミノ酸を含む）全てを同定する。さらなる実施形態には、T I M P - 3に対して相互作用RAPリジンがマッピングされたL R P 1 / R A P（受容体関連タンパク質）の結晶構造に基づき、T I M P - 3のリジンと相互作用するL R P 1を変異させることが含まれる。

【0056】

さらなる組み合わせが、本明細書中、企図されている。例えば、本明細書中記載される任意の変異を、リジン残基での変異と組み合わせて起こすことができ、リジン残基はT I M P - 3の任意のリジン残基である。1つの実施形態において、1つのリジンを変異させる；別の実施形態では、2つ、3つ、4つ、または5つのリジン残基を、変異させる。ある特定の実施形態において、アミノ酸45位及び/または133位におけるリジン残基を、変異させることができる。別の例では、変異は、単独のN結合型グリコシル化部位を導入する；この変異は、さらなるグリコシル化部位を導入するさらなる変異、または、T I M P - 3の別の性質に影響するように設計された他の変異とともに起こすことができる。

50

本明細書中、企図されているものは、1つのN結合型グリコシル化部位が導入されたT I M P - 3ムテインまたは変異体、2つ、3つ、または4つのN結合型グリコシル化部位が導入されたT I M P - 3ムテインまたは変異体、及び5つ以上のN結合型グリコシル化部位が導入されたT I M P - 3ムテインまたは変異体である。

【0057】

特定の変異は、2014年3月12日出願の米国特許出願第14/207,178号及び2014年3月13日出願のPCT出願第PCT/US2014/026811号の図1及び2に示されており、これらの開示は、本明細書中参照として援用される。これらの図は、天然の全長ヒトT I M P - 3と突然変異型の全長ヒトT I M P - 3の配列比較を示し、後者では、配列内の特定のアミノ酸を文字「X」に置き換えてある。シグナル配列には下線が引いてある；したがって、本明細書に記載のとおり、他のシグナル配列が置き換わることができる。10

【0058】

選択されたムテインのアミノ酸配列を、本明細書中、配列表に示す。全長タンパク質配列を提示する。多くの場合、本明細書中使用されるアミノ酸設計の一貫したアミノ酸残基番号方式を行いやすくするとともに、当業者が理解しやすいようにするために、シグナル配列は、配列表の様々なムテインについて記載される配列に入れていらない。本発明は、本明細書中記載されるムテイン配列にさらにシグナル配列を含むものを包含し、シグナル配列は、様々な実施形態において、配列番号2に第1 - 23番アミノ酸として提示される配列（すなわち、M T P W L G L I V L L G S W S L G D W G A E A）である。配列番号2は、代表的な天然型T I M P - 3アミノ酸配列である。当業者には当然のことながら、シグナルペプチドは、タンパク質のプロセシング中に除去されて、アミノ酸システインで始まるN末端を持つ成熟タンパク質をもたらす。様々な実施形態において、N末端システインは、T I M P - 3ムテインにおいて保存される。当業者には同じく当然のことながら、細胞でのT I M P - 3ムテインDNAの発現とタンパク質単離との間に、タンパク質の翻訳後修飾が起こる。翻訳後修飾の具体例として、グリコシル化（例えば、N結合型グリコシル化）及びシグナルペプチドの除去が挙げられる；リン酸化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、脂質化、タンパク質分解などを含むさらなる修飾も企図されている。20

【0059】

天然型T I M P - 3シグナル配列を用いてT I M P - 3ムテインを発現させることができ、または別のシグナル配列が置き換わることが可能であることが、知られている。すなわち、残基1位のアミノ酸は、Mであることも別のアミノ酸であることも可能である；残基2位のアミノ酸は、Tであることも別のアミノ酸であることも可能であり、残基3位のアミノ酸は、Pであることも別のアミノ酸であることも可能であり、など、アミノ酸23位まで同様である。さらに、シグナル配列は、さらなるアミノ酸を含むことも可能であるし（すなわち、天然型T I M P - 3のシグナル配列より長い）、または23より少ないアミノ酸を含むことも可能である（すなわち、天然型T I M P - 3のシグナル配列より短い）。シグナル配列の長さに関わらず、当業者なら、本明細書中の番号方式を利用して、本開示のT I M P - 3ムテイン、ならびに作製可能な他のムテインを調製することができるだろう。30

【0060】

成熟型のT I M P - 3には、ある特定の置換が考えられ、本明細書中、それらは「n # m」として表され、表示中「n」は天然の全長T I M P - 3に見出されるアミノ酸を表し、「#」はアミノ酸残基番号を表し、「m」は、置き換わったアミノ酸を表す。すなわち、例えば、「K 4 5 N」は、第45番アミノ酸であるリジン（K）がアスパラギン（N）に置換されたことを示す。本明細書中例示される変異型のヒトT I M P - 3は、以下の変異を含む（単独または組合せで）：K 4 5 N；V 4 7 T；K 5 0 N；V 5 2 T H 7 8 N；K 9 4 N；E 9 6 T；D 1 1 0 N；K 1 1 2 T；R 1 3 8 T；及びG 1 7 3 T。これらの変異の組合せも企図されており、そのような組合せには、上述の置換のうち2つ～1240

(即ち、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、または12)を含むことができる。例えば、1つの実施形態において、T I M P - 3ムテインは、以下の置換を有する配列番号2の第24-211番アミノ酸を含む(またはそれらアミノ酸からなる): H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、及びR138T。

【 0 0 6 1 】

【 0 0 6 2 】

さらなる組み合わせとして、K 5 0 N / V 5 2 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8
T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3
T ; H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N
/ V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / A 8 0 T、R 1 3 8 T ; K 4 5 N / V 4 7
T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、
H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0
T、K 9 4 N / E 9 6 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1
1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N
/ Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1
3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3
T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T ;
K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2
T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、R 1
3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、
K 9 4 N / E 9 6 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9
4 N / E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、K 9
4 N / E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 4 5 N / V 4 7 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、
D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T ; K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q
8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T ; 及び K 4 5 N / V 4 7 T、
K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T が挙げ
られる。

[0 0 6 3]

様々な実施形態において、ムテインは、K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T（配列番号3）；K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T（配列番号4）；K 4 5 N、V 4 7 T、P 5 6 N、G 5 8 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号5）；K 4 5 N、V 4 7 T、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T（配列番号6）；K 4 5 N、V 4 7 T、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T（配列番号7）；K 4 5 N、V 4 7 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号8）；K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、G 1 7 3 T（配列番号9）；K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号10）；K 4 5 N、V 4 7 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号11）；K 4 5 S、F 5 7 N、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号12）；K 4 5 S、F 5 7 N、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T（配列番号13）；K 5 0 N、V 5 2 T、P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号14）；K 5 0 N、V 5 2 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号15）；K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号16）；K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号17）；K 5 0 N、V 5 2 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号18）；K 5 0 N、V 5 2 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号19）；P 5 6 N、G 5 8 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T（配列番号20）；P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T（配列番号21）；P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T（配列番号22）；P 5 6 N、G 5 8 T、H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、G 1 7 3 T（配列番号23）；P 5 6 N、G 5 8 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号24）；H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T（配列番号25）である。

【0064】

TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型TIMP-3のものと非常に類似したアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型TIMP-3と少なくとも85%同一であるだろう；別の実施形態において、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型TIMP-3と少なくとも90%同一であるだろう；別の実施形態において、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型TIMP-3と少なくとも95%同一であるだろう。さらなる実施形態において、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型TIMP-3と少なくとも96%同一、97%同一、98%同一、または99%同一である。本明細書中使用される場合、同一性パーセントは、成熟した全長型の天然型TIMP-3、すなわち、シグナルペプチドを欠いたTIMP-3（TIMP-3のアミノ酸24番-211番）に対する、成熟した全長変異体、ムテイン、または誘導体の比較を示す。当業者ならすぐにわかるだろうが、TIMP-3のN末端ドメインの変異体、ムテイン、または誘導体と天然型TIMP-3のN末端ドメインとの間で同様な比較を行うことができる。

【0065】

類似性は、ムテインまたは変異体と天然型TIMP-3との間で異なるアミノ酸の個数によっても表すことができる。例えば、TIMP-3変異体またはムテインは、天然型TIMP-3と、1つのアミノ酸、2つのアミノ酸、3つのアミノ酸、4つのアミノ酸、5つのアミノ酸、6つのアミノ酸、7つのアミノ酸、8つのアミノ酸、9つのアミノ酸、または10のアミノ酸が異なることが可能である。天然TIMP-3と10のアミノ酸が異なる変異体またはムテインは、天然型TIMP-3に対して約95%同一であるだろう。さらなる実施形態において、TIMP-3変異体またはムテインは、天然成熟TIMP-3と、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のアミノ酸

10

20

30

40

50

が異なる。

【0066】

TIMP-3ポリペプチド(天然型、ムテイン、変異体、または誘導体のいずれか)をコードする核酸にさらなる変更を加えて、発現を促進することができる。例えば、天然型TIMP-3のシグナルペプチドを異なるシグナルペプチドで置換することができる。

【0067】

本発明の範囲内に含まれるTIMP-3ポリペプチドの他の誘導体として、TIMP-3ポリペプチドまたはその断片と他のタンパク質またはポリペプチドとの、共有結合によるまたは凝集による結合体、例えば、TIMP-3ポリペプチドのN末端またはC末端と融合した異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現によるものなどが挙げられる。例えば、結合したペプチドは、異種シグナル(またはリーダー)ペプチド、例えば、酵母菌アルファ因子リーダー、またはエピトープタグなどのペプチドであってもよい。当業者には当然ながら、異種シグナルペプチドは、天然型TIMP-3シグナルペプチドと長さが異なってもよく、それでも、異種シグナルペプチドを用いて產生されたTIMP-3ポリペプチドのN末端システイン残基を整列させることによって、成熟TIMP-3のアミノ酸配列に関してムテインの位置を正しく同定することができる。

【0068】

TIMP-3ポリペプチドを含有する融合タンパク質は、TIMP-3ポリペプチドの精製または同定を容易にするために付加されたペプチド(例えば、ポリHis)を含むことができる。別のタグペプチドとしては、Hopp et al., Bio/Tech nology 6:1204, 1988、及び米国特許第5,011,912号に記載されるFLAG(登録商標)ペプチドがある。FLAG(登録商標)ペプチドは抗原性が高く、特定のモノクローナル抗体(mAb)に可逆的に結合されるエピトープを提供し、発現した遺伝子組換えタンパク質の迅速なアッセイと容易な精製を可能にする。FLAG(登録商標)ペプチドが所定のポリペプチドに融合されている融合タンパク質を調製するのに有用な試薬は、市販されている(Sigma, St. Louis, MO)。

【0069】

様々な実施形態において、本明細書中記載されるTIMP-3ポリペプチド(例えば、本明細書中記載されるTIMP-3ムテインの任意の1種)は、in vivoでのポリペプチド半減期を延長する部分と融合している。部分の例として、抗体(例えば、IgG)またはその断片(例えば、IgGなどの抗体のFc部分)またはアルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)が挙げられるが、これらに限定されない。これとは別にまたはこれに加えて、TIMP-3ポリペプチドは、in vivoで投与された場合にアルブミンと結合するアルブミン結合ドメインまたは脂肪酸を含む。アルブミン結合ドメインの例は、4-(p-ヨードフェニル)-ブタン酸に由来する部分である「albu-タグ」である(Dumelin et al., Angew Chem Int Ed Engl 47:3196-3201 (2008))。この部分は、TIMP-3ポリペプチドのN末端と融合してもC末端と融合してもよく、この部分自身、どちら向きにあってもよい(すなわち、NまたはC末端部分で接続される)。任意選択で、この部分は、リンカー、例えばフレキシブルペプチドリンカー(例えば、1~10または2~4つのグリシン、例えば、4つのグリシンを含むリンカー、あるいはEPKSS(配列番号75))を介してTIMP-3ポリペプチドと結合している。本明細書中記載されるTIMP-3ポリペプチド用融合パートナーの例として、配列番号71のヒト血清アルブミン、配列番号72のヒトFcG1、配列番号73のFc-mono、及び配列番号74のヒトFc-mono Nde15が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は、本明細書中記載されるムテイン(例えば、配列番号:3~26)のいずれかと本明細書中記載される融合パートナー(例えば、配列番号:71~74)のいずれかとが融合して含まれている融合タンパク質を企図している。

【0070】

共有結合修飾物もまた、TIMP-3ポリペプチドの誘導体とみなされて、本発明の範

10

20

30

40

50

囲内に含まれ、そのような修飾は、必ずという訳ではないが概して翻訳後に行われる。例えば、抗原結合タンパク質の特定のアミノ酸残基と、選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基と反応できる有機誘導体化剤とを反応させることにより、T I M P - 3 の複数の種類の共有結合修飾物が分子に導入される。

【0071】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロルアセトアミドなどのアルファ - ハロ酢酸化合物（及び相当するアミン）と反応して、カルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、アルファ - プロモ - ベータ - (5 - イミダゾリル) プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N - アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジル = ジスルフィド、メチル = 2 - ピリジル = ジスルフィド、p - クロロメルクリ安息香酸、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、またはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によって誘導体化される。したがって、本発明の1つの態様において、システイニル残基を、例えば、選択したコドンを変化させてCysをコードさせることによって、天然型T I M P - 3配列に付加する。そのようなCys置換は、発現、フォールディング、または本明細書中示されるとおりの他の性質に重要であることが明らかになっている、T I M P - 3中の領域で行うことができる。

【0072】

本発明のタンパク質の炭水化物部分の個数は、タンパク質にグリコシドを化学的または酵素的にカップリングさせることにより、増やすことができる。こうした手順は、N結合型及びO結合型グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞でタンパク質を产生することを必要としない点で有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖は、(a)アルギニン及びヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)システィンの遊離スルフヒドリル基などの遊離スルフヒドリル基、(d)セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基などの遊離ヒドロキシル基、(e)フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基などの芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基、に付加される場合がある。これらの方法は、1987年9月11日公開のWO 87 / 05330、及びApplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259 - 306に記載される。

【0073】

出発物質の組換えタンパク質に存在する炭水化物部分の除去は、化学的に行うことも酵素的に行うこともできる。化学的脱グリコシル化では、タンパク質をトリフルオロメタンスルホン酸化合物または同等の化合物と接触させることが必要である。この処理は、ポリペプチドを無傷なまま残しつつ、連結糖(N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン)を除くほとんどまたは全ての糖の切断をもたらす。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52、及びEdge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131に記載される。ポリペプチドの炭水化物部分の酵素切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350に記載されるような種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成できる。グリコシル化可能部位でのグリコシル化を、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105に記載されるように、ツニカマイシン化合物の使用によって防いでもよい。ツニカマイシンは、タンパク質 - N - グリコシド結合の形成を妨げる。

【0074】

抗原結合タンパク質の別の種類の共有結合修飾物は、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号、または同第4,179,337号に記載される様式で、タンパク質と様々な非タンパク質重合体との結合を含み、そのような非タンパク質重合体とし

10

20

30

40

50

て、ポリエチレングリコール（例えば、大きさ約40kD、30kD、20kD、10kD、5kD、または1kDのPEG）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンなどの種々のポリオールが挙げられるが、これらに限定されない。他の有用な重合体として、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、セルロース、ポリ(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール同種重合体、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリシアル酸(PSA)、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、及びポリビニルアルコール、ならびに上記のいずれかのものの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。1つの態様において、本発明のTIMP-3ポリペプチドは、PEG化ペプチドである。また、当該分野で既知であるとおり、そのような重合体の付加を容易にするために、タンパク質内の様々な位置でアミノ酸置換を行ってもよい。

【0075】

様々な態様において、本発明のTIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体に到達するための天然型TIMP-3アミノ酸配列に対する修飾は、天然型TIMP-3活性を実質的に弱めない。例えば、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、好ましくは、1種または複数のマトリクスマタロプロティナーゼ（例えば、MMP-2、MMP-9、及び/またはMMP-13）を阻害し、1種または複数のアグリカナーゼ(ADAMS)（例えば、ADAMTS4及び/またはADAMTS5）を阻害し、腫瘍壊死因子アルファ(TNF-アルファ)変換酵素(TACE)を阻害し、in vitroまたはin vivoでTNF-アルファ産生を阻害し、細胞外基質分解を阻害し、及び/または炎症を阻害する。TIMP-3ポリペプチドの活性を特性決定する方法の例は、実施例に提示される。任意選択で、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、上記に記載される活性をはじめとする天然型TIMP-3に付随する活性のいずれか1種を、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%発揮する。これの代わりにまたはこれに加えて、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、任意選択で、天然型TIMP-3と比べて10倍以内で低下した、5倍以内で低下した、または2倍以内で低下した活性（例えば、MMP-2またはMMP-9阻害）を発揮する。

【0076】

TIMP-3ポリペプチドの発現

当該分野で既知の任意の発現系を使用して、本発明の組換えポリペプチドを作製することができる。一般に、宿主細胞を、所望のTIMP-3ポリペプチド(TIMP-3ムテインまたは変異体を含む)をコードするDNAを含む組換え発現ベクターで形質転換する。使用可能な宿主細胞の中には、原核生物、酵母菌、または高等真核生物細胞がある。原核生物として、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌または桿菌が挙げられる。高等真核生物細胞として、昆虫細胞及び哺乳類起源の確立された細胞株が挙げられる。適した哺乳類宿主細胞株の例として、サル腎臓細胞COS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株、及びMcMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821に記載されるとおりのアフリカミドリザル腎臓細胞株CVI由来のCVI/E BNA細胞株(ATCC CCL 70)が挙げられる。細菌、真菌、酵母菌、及び哺乳類細胞宿主とともに使用するのに適切なクローニングベクター及び発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)に記載される。

【0077】

哺乳類細胞での発現は、天然型TIMP-3のものと非常によく似た高次構造のフォー

10

20

30

40

50

ルディング及び適合を容易にするという点で、T I M P - 3 ポリペプチドの產生に利点を提供することができる。数多くの哺乳類細胞発現系が、当該分野で既知である、及び／または市販されている；市販されている系として、例えば、G i b c o (登録商標) F r e e d o m (登録商標) C H O - S (登録商標) (チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 由来懸濁培養液での組換えタンパク質のクローニング及び発現の全ての側面で容易に使用できるよう設計された製品；P r o B i o G e n 、L i f e T e c h n o l o g i e s ; C a r l s b a d 、C A) 、G S G e n e E x p r e s s i o n S y s t e m (商標) (高収率で安定したc G M P 適合性哺乳類細胞株の發生を提供するように設計された形質移入系；L o n z a B i o l o g i c s 、S l o u g h 、U K) 、P E R . C 6 (登録商標) 技術 (組換えタンパク質の大規模產生を容易にするよう設計されたツールの一揃い、単一の不死化ヒト細胞に由来する細胞の連續分化物一式を利用する；C r u c e l l 、L e i d e n 、T h e N e t h e r l a n d s) 、または、C A P 及びC A P - T (複合タンパク質の発現及び產生のための、ヒト細胞を利用した発現系；C e v e c 、C o l o g n e 、G e r m a n y) などの不死化羊膜細胞、が挙げられる。

10

【0078】

さらなる細胞発現系として、S e l e x i s S U R E t e c h n o l o g y P l a t f o r m (商標) (様々な細胞株に適用して組換えタンパク質の產生用細胞株の發生を容易にすることができる技術基盤；S e l e x i s I n c . 、S w i t z e r l a n d) ；P r o F e c t i o n (登録商標) M a m m a l i a n T r a n s f e c t i o n S y s t e m s (組換えタンパク質の產生のため細胞への高効率形質移入を提供する形質移入系；P r o m e g a 、M a d i s o n W I) ；E x p i 2 9 3 (商標) E x p r e s s i o n S y s t e m (高密度哺乳類一過性タンパク質発現系、L i f e T e c h n o l o g i e s 、G r a n d I s l a n d 、N Y) ；及びM a x C y t e (登録商標) V L X (商標) 及びS T X (商標) T r a n s i e n t T r a n s f e c t i o n S y s t e m s (抗体をはじめとする組換えタンパク質の產生用の規模拡大可能な形質移入系；M a x C y t e 、G a i t h e r s b u r g 、M D) などが挙げられる。当業者なら、さらに、例えば、W i g l e r e t a l . (C e l l 1 9 7 9 : 7 7 7) が最初に記載した技術、及び、例えば、カナダ国立研究機関のウェブサイトに記載のさらなる技術など、他の発現系も思い当たる。

20

【0079】

様々な容器が、当該分野で、形質転換細胞の培養及び組換えタンパク質の產生に適していると既知である。こうした容器として、2 4 ディープウェルプレート、2 5 0 m L 及び1 L の振盪フラスコ；ならびに種々のサイズの様々なバイオリアクター、例えば、2 L 、5 L 、1 0 L 、3 0 L 、1 0 0 L 、1 0 0 0 L 、1 0 0 0 0 L 、及びそれより大きいバイオリアクターが挙げられる。他にも細胞培養に適した容器が当該分野で既知であり、同じく本明細書中記載されるとおりに使用することができる。

30

【0080】

細胞培養培地配合は、当該分野で周知である；典型的には、培養培地は、細胞が最低限の増殖及び／または生存のために必要とする、必須及び非必須アミノ酸、ビタミン、エネルギー源、脂質、及び微量元素、ならびに緩衝液及び塩を提供する。培養培地はまた、増殖及び／または生存を最低限の速度より向上させる補足成分も含有してよく、そのような成分として、ホルモン及び／または他の増殖因子、特定のイオン（ナトリウム、塩素、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸イオンなど）、緩衝液、ビタミン、ヌクレオシドまたはヌクレオチド、微量元素（無機化合物、通常は非常に低い最終濃度で存在する）、アミノ酸、脂質、及び／またはグルコースもしくは他のエネルギー源が挙げられるが、これらに限定されない；本明細書中記載されるとおり、細胞周期阻害物質を、培養培地に加えることができる。ある特定の実施形態において、培地は、有利なことに、細胞の生存及び増殖に最適なp H 及び塩濃度で配合される。ある特定の実施形態において、培地は、細胞培養の開始後に加えられる流加培地である。ある特定の実施形態において、細胞培養培地は、開始時の栄養液と細胞培養の開始後に加えられる任意の流加培地との混合物である。

40

50

【0081】

限定培養培地をはじめとして様々な組織培養培地が市販されており、例えば、以下の細胞培養培地のいずれか1つまたは組み合わせを使用することができる：特に、RPMI-1640培地、RPMI-1641培地、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、イーグル最小必須培地、F-12K培地、ハムF12培地、イスコフ改変ダルベッコ培地、マッコイ5A培地、ライボビツツL-15培地、及びEX-CELL(商標)300シリーズ(JRH Biosciences, Lenexa, Kansas)などの無血清培地。こうした培地の無血清版もまた利用できる。細胞培養培地には、培養しようとする細胞の必要条件及び／または所望の細胞培養パラメーターに応じて、アミノ酸、塩、糖、ビタミン、ホルモン、増殖因子、緩衝液、抗生物質、脂質、微量元素など、追加の成分を補充したり、成分の濃度を高めたりしてもよい。

10

【0082】

形質転換細胞は、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養でき、ポリペプチドは従来のタンパク質精製手順によって回収できる。そのような精製手順の1つとして、アフィニティークロマトグラフィーならびに当分野で既知の他の方法の使用が挙げられる。哺乳類の上清から親TIMP-3またはTIMP-3ムテインを単離する1つの方法は、カルボキシ末端 $6 \times$ ヒスチジンタグと融合したTIMP-3を $6 \times$ ヒスチジン親和性Ni-セファロース樹脂と組み合わせて利用することである（例えば、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)；一般的な手順は当該分野で既知であり、そのような手順のための試薬及び例が、QIAGEN, Germantown, MD及びGE Health care, Pittsburgh, PAによって概説されている）。カチオン交換クロマトグラフィー（例えば、SP-HPセファロース（登録商標）、GE Health care）を利用して、IMAC溶出後にTIMP-3をさらに単離することができ、あるいは、代替的戦略としてIMACを用いずに哺乳類の上清からTIMP-3を捉えることができる（中性pHで塩化ナトリウム勾配を用いると、TIMP-3及びそのムテインの溶出が起こる）。サイズ排除クロマトグラフィー（例えば、Superdex 200（登録商標）、GE Health care（移動相の例：10 mMのNa₂HPO₄、1.8 mMのKH₂PO₄、137 mMのNaCl、2.7 mMのKCl））は、TIMP-3またはそのムテインをさらに単離するのに用いることのできる一般的な手段である（IMACプロセスまたはイオン交換クロマトグラフィーと組み合わせて）。これらの方

20

及び他の方法は当該分野で既知であり、例えば、Protein Purification: Principles: High Resolution Methods, and Applications, Third Edition (2012, John Wiley and Sons; Hoboken, NJ)を参照。

30

【0083】

ポリペプチド（天然型TIMP-3またはTIMP-3ムテインもしくは変異体）の量は、細胞培養上清液、すなわち、馴化培地(CM)中の組換えTIMP-3（天然型、変異体、またはムテイン）の量の分析を可能にする任意の適切な定量的または半定量的方法により測定することができる。適切な定量的または半定量的方法として、ウェスタンプロット法及びクーマシー染色SDS PAGEゲルが挙げられる。定量的測定として、ヒトTIMP-3 ELISA(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)などの酵素免疫測定、または抗体を介したTIMP-3捕捉を用いるForte Bio Octet（登録商標）(Pall Forte Bio Corp, Menlo Park, CA)、または精製したTIMP-3での直接UV（紫外線）吸光度(280 nm)測定の使用を挙げることができる。

40

【0084】

すなわち、TIMP-3中の特定の変異の効果は、作製された組換えムテイン量を、同様な培養条件下で作製された天然タンパク質量と比較することにより評価することができる。TIMP-3ムテインまたは変異体は、天然型TIMP-3で観測されるレベルよりも1×、2×、3×、4×、5×、10×、またはそれより高いレベルで発現することが

50

できる。所望であれば、特定の形質転換または形質移入細胞株の比産生性を決定することにより、様々な型の T I M P - 3 について比産生性を比較することができる。比産生性、すなわち q P は、1 日あたり 1 細胞あたりの組換えタンパク質のピコグラム (p g / c / d) で表され、培養物中の細胞を定量する当該分野で既知の方法及び組換えタンパク質を定量する上記方法を適用することにより、容易に決定できる。

【 0 0 8 5 】

T I M P - 3 ポリペプチドの使用

T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、例えば、アッセイで使用することができ、またはそれらは、T I M P - 3 活性のレベルがより高いことが望まれる任意の症状（すなわち、マトリクスメタロプロテアーゼ (M M P) 及び / または T I M P - 3 により阻害されるまたは阻害される可能性がある他のプロテイナーゼが原因または増悪役割を果たす症状）を治療するのに使用することができ、そのような症状として、炎症性症状、変形性関節症、及び過剰なまたは不適切な M M P 活性が生じている他の症状（例えば、心筋虚血、再灌流傷害、脈管障害、新生内膜形成、及び慢性心不全（例えば、うつ血性心不全）の進行最中）が挙げられるが、これらに限定されない。炎症性症状として、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) 、及び特発性肺線維症 (I P F) 、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、及びセリアック病）、乾癬、ウイルス性心筋炎を含む心筋炎、粥状動脈硬化に関連した炎症、ならびにリウマチ様関節炎、乾癬性関節炎などの関節炎症状が挙げられる。

10

【 0 0 8 6 】

本明細書中記載される T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体組成物は、病原を修飾し、基質分解及び / または炎症を特徴とする疾患または症状、すなわちメタロプロテイナーゼが有害な役割を果たす疾患または症状に対して有益な治療を提供する。本組成物は、単独で使用しても、そのような症状を治療する 1 種または複数の作用剤と併用してもよい。したがって、本 T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体組成物は、過剰な基質減少（分解）がメタロプロテイナーゼ活性により引き起こされている任意の障害の治療に有用である可能性がある。本発明の T I M P - 3 変異体、ムテイン、または誘導体組成物は、単独でも他の薬物と併用しても、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、アグリカナーゼ、または他の基質分解もしくは炎症促進酵素の過剰產生と関連した様々な障害の治療に有用であり、そのような障害として、栄養障害型表皮水疱症、変形性関節症、偽痛風、若年性リウマチ様関節炎をはじめとするリウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、強皮症、歯周病、角膜の、表皮の、または胃の潰瘍化を含む潰瘍化、術後創傷治癒、及び再狭窄が挙げられる。過剰なコラーゲン及び / またはプロテオグリカン分解が役割を果たしている可能性があり、したがって T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体組成物を適用可能である他の病態として、肺気腫、骨パジェット病、骨粗鬆症、強皮症、褥瘡で起こるものなどの骨または組織の圧迫萎縮、真珠腫、及び異常創傷治癒が挙げられる。直接または間接的に、T I M P - 3 量の低下またはメタロプロテアーゼ量の増加の結果であるさらなる症状（例えば、心筋虚血、再灌流傷害、うつ血性心不全の進行最中のもの）もまた、本開示の組成物を、単独でまたはそのような症状を患っている個体を治療するのに一般的に使用される他の薬物と併用して、治療することができる。本明細書中開示される組成物は、血管ブラーク安定化に、及び血管新生内膜形成阻害に有用である。T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体組成物は、さらに、他の創傷治癒促進剤の補助剤として、例えば、治癒過程のコラーゲンの代謝回転を促進するのに適用できる。

30

【 0 0 8 7 】

多くのメタロプロテイナーゼは、炎症促進性活性も示す；したがって、さらなる実施形態として、炎症及び / または自己免疫障害の治療法が挙げられ、障害としては、軟骨炎症、及び / または骨分解、関節炎、リウマチ様関節炎、小関節型リウマチ様関節炎、多関節型リウマチ様関節炎、全身型リウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、腸炎性関節炎、反応性関節炎、S E A 症候群（血清陰性、腱付着部症、関節症症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎

40

50

、強皮症、全身性紅斑性狼瘡、血管炎、筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、変形性関節症、結節性多発性動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、類肉腫症、硬化症、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆位乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、粥状動脈硬化、狼瘡、スチル病、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、重症筋無力症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリアック病（非熱帯性スブルー）、血清反応陰性関節症に関連した腸疾患、顕微鏡的またはコラーゲン性大腸炎、好酸球性胃腸炎、または直腸結腸切除術及び回腸肛門吻合術後に生じる囊炎、膵炎、インシュリン依存性真性糖尿病、乳腺炎、胆嚢炎、胆管炎、胆管周囲炎、多発性硬化症（MS）、喘息（外因性及び内因性喘息ならびに気道の関連慢性炎症性症状、または反応性亢進を含む）、慢性閉塞性肺疾患（COPD。すなわち、慢性気管支炎、肺気腫）、急性呼吸障害症候群（ARDS）、呼吸促迫症候群、囊胞性線維症、肺高血圧症、肺血管狭窄、急性肺損傷、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性肺炎、気管支炎、アレルギー性気管支炎気管支拡張症、結核、過敏性肺炎、職業性喘息、喘息様障害、サルコイド、反応性気道疾患（または機能障害性）症候群、綿肺症、間質性肺疾患、好酸球増加症候群、鼻炎、副鼻腔炎、及び肺寄生虫症、ウイルス誘導型症状に関連した気道過敏症（例えば、呼吸器多角体ウイルス（RSV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）、ライノウイルス（RV）、及びアデノウイルス）、ギラン・バレー病、グレーブス病、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、GVHDなどが挙げられるが、これらに限定されない。TIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、TIMP-3の相対レベルの低下（すなわち、内因性TIMP-3対メタロプロテアーゼの比の低下、これはTIMP-3量の低下の結果であってもメタロプロテアーゼ量の増加の結果であってもよい）が病理効果と関連する場合、例えば、心筋虚血、再灌流傷害、及び慢性心不全の進行最中にも用途がある。
10

【0088】

TIMP-3が持つ、結合組織分解を阻害する能力に基づいて、TIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、血管新生阻害が有用である場合、例えば、腫瘍の発達の予防または抑制、及び寄生虫の侵入の予防に用途がある。例えば、腫瘍の浸潤及び転移の分野では、ある特定の腫瘍の転移能は、コラゲナーゼを合成し分泌する能力の向上に相関し、相当量のメタロプロテイナーゼ阻害物質を合成し分泌する能力のなさに相関する。本開示のTIMP-3タンパク質はまた、原発性腫瘍の除去中、化学療法及び放射線療法中、汚染された骨髄の採取中、及びがん性腹水のシャント手術中、腫瘍細胞転移を阻害するのにも治療用途がある。診断面では、腫瘍試料にTIMP-3産生がないこととその転移能の相関関係が、予後指標として、並びに可能な予防治療のための指標として、有用である。
20

【0089】

MMPはまた、血液脳関門（BBB）を開けるための経路の一部として、脳の基底層及び密着結合タンパク質に作用し、炎症の細胞及び可溶性メディエーターを脳に入りやすくする。したがって、本発明の組成物及び方法は、BBBの過剰なまたは不適切な透過化を特徴とする神経系障害の治療に有用である。さらに、ニューロン周囲の基質タンパク質の分解は、接触の損失及び細胞死をもたらす可能性がある；したがって、開示されるTIMP-3組成物は、神経細胞を取り囲む基底膜を保存することによって、神経細胞を損傷から保護する場合がある。本発明のTIMP-3組成物は、損傷、例えば、脳虚血、または外傷性脳損傷に対する神経炎症性反応の治療または寛解に有用である。本明細書中開示される組成物はまた、炎症が、疾患、例えば、多発性硬化症の根本原因である神経変性疾患の治療においても、ならびに、種々の形式のニューロパチー及び/またはミオパチー、脊椎損傷、及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療においても有用となるだろう。したがって、本発明の組成物の使用は、BDNF、NT-3、NGF、CNTF、NDF、SCF、または他の神経細胞の成長もしくは増殖調節因子との同時投与が関与してもよい。または、本発明の組成物及び方法は、結合組織破壊の局所的阻害が組織の外観を変化させる可能性があるという点で美容目的にも適用可能である。
30
40
50

【0090】

TIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、in vitroの手順に使用されるか、in vivoで投与されて、内因性TIMP-3活性を増大させ及び／またはTIMP-3誘導型生物活性を向上させてもよい。本発明のTIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、内因性TIMP-3が下方制御されているまたは低レベルで存在する状況下、in vivoで使用されてもよい。すなわち、TIMP-3により阻害可能なプロテイナーゼにより引き起こされるまたは悪化する（直接または間接的に）障害が治療可能であり、それらの例は、本明細書中に提示される。1つの実施形態において、本発明は、治療方法を提供し、本方法は、TIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体、あるいはTIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体をコードする核酸（例えば、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスベクター）などの発現ベクターに存在させて）を、そのような治療を必要としている哺乳類に、TIMP-3誘導型生物活性を向上させるのに有効な量でin vivoで投与することを含む。別の実施形態において、本発明は、治療方法を提供し、本方法は、TIMP-3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体を、そのような治療を必要としている哺乳類に、TIMP-3の内因性レベルを上昇させるのに有効な量でin vivoで投与することを含む。

10

【0091】

例えば、本発明は、障害、例えば上記の障害の任意の1種などを治療する方法を提供し、本方法は、そのような治療を必要としている対象に、その障害を治療するのに有効な量のTIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体を投与することを含む。本発明はさらに、障害、例えば上記の障害の任意の1種などの治療における、本明細書中開示されるTIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体の使用、ならびに障害の治療用医薬の製造におけるTIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体の使用を提供する。当然のことながら、「treating」及び「treatment」は、障害に関連する症候の重篤度及び／または発生における任意の減少を示す。障害またはそれに関連する症候に対する保護度合い、またはそれらの寛解は、どの程度であっても、対象、例えばヒト患者にとって有益なものである。

20

【0092】

本発明に含まれるのは、心臓細胞外基質（ECM）分解及び／または有害リモデリングを阻害する方法であり、これには任意選択で心筋梗塞（例えば、急性心筋梗塞）が関連する。本方法は、そのような方法を必要としている対象に、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体を治療上有効量で投与し、それによりECM分解及び／または有害リモデリングを阻害することを含む。本発明の文脈において、完全阻害は必要ではない；ECM分解及び／または有害な心臓リモデリングにおける任意の度合いの減少が企図されている。ECM恒常性は、梗塞後数時間で破壊され、ECM不安定性及び有害な心臓リモデリングを引き起こす。有害な心臓リモデリングは、心臓の構造的及び機能的变化、例えば心室壁厚減少、左心室拡大（LV EDV上昇）、収縮期及び拡張期機能障害（%駆出率（EF）低下）、梗塞拡大、そして最終的には心不全をもたらす。ECM恒常性の維持（全体でまたは部分的に）は、組織損傷の重篤度を低下させ、心機能を改善する。したがって、1つの態様において本方法は、対象に心筋梗塞（または本明細書中記載される障害のいずれか）の危険性があると診断された後できるだけ速やかに、または心筋梗塞が検出された後できるだけ速やかに行われる。例えば、少なくとも1つの実施形態において、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体は、心筋梗塞の1、2、3、4、5、6、7、8、12、または24時間以内に投与される。任意選択で、TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体の投与は、心筋梗塞後の駆出率に少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも10%、または少なくとも15%の改善（TIMP-3変異体、ムテイン、または誘導体を投与されなかった対象のEFと比較して）をもたらし、及び／または心拍出量の改善、及び／または左心室壁厚減少の縮小、及び／または収縮終期容積もしくは拡張終期容積の増加もしくは維持をもたらす。

30

40

50

【0093】

別の態様において、本発明は、*in vivo*半減期が向上したT I M P - 3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体を提供する。1つの実施形態において、T I M P - 3ムテインの半減期は、天然型T I M P - 3のものの少なくとも2倍である；別の実施形態において、半減期は、天然型T I M P - 3のものの少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、または10倍以上である。これの代わりにまたはこれに加えて、T I M P - 3変異体、ムテイン、または誘導体は、天然型T I M P - 3（例えば、配列番号2または配列番号2の第1-144番アミノ酸）よりも少なくとも0.5時間長い、少なくとも1時間長い、少なくとも1.5時間長い、少なくとも2時間長い、少なくとも3時間長い、少なくとも6時間長い、少なくとも8時間長い、少なくとも10時間長い、少なくとも12時間長い、または少なくとも24時間長い半減期を有する。1つの実施形態において、半減期は非ヒト哺乳類で決定される；別の実施形態において、半減期は、ヒト対象で決定される。様々な実施形態において、T I M P - 3ムテイン、変異体、または誘導体は、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間、またはそれ以上、例えば、最長24時間、最長18時間、最長13時間、または最長12時間の半減期を有する。さらなる実施形態は、*in vivo*で（例えば、ヒト対象に投与した場合に）少なくとも1日間の半減期を有するT I M P - 3ムテインまたは変異体を提供する。1つの実施形態において、T I M P - 3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、少なくとも3日間の半減期を有する。別の実施形態において、T I M P - 3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、4日間以上、または5日間以上の半減期を有する。別の実施形態において、T I M P - 3ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体は、8日間以上の半減期を有する。全身半減期を測定することもできるし（例えば、血漿で）、局所的な、*in situ*半減期を測定することもできる（例えば、心臓組織で、または局所投与部位に隣接する組織で）。

【0094】

別の実施形態において、T I M P - 3ポリペプチド、変異体、またはムテインは、誘導体化されていないまたは修飾されていないT I M P - 3結合タンパク質と比較した場合にその半減期が長くなっているように、誘導体化または修飾される。誘導体化ポリペプチドは、ポリペプチドに所望の性質、例えば特定用途で長くなつた半減期を付与する任意の分子または物質を含むことができる。誘導体化ポリペプチドは、例えば、検出可能な（または標識）部分（例えば、放射性、比色用、抗原性、もしくは酵素的分子、検出可能なビーズ（磁気ビーズまたは電子密度の高い（例えば、金）ビーズなど）、または別の分子と結合する分子（例えば、ビオチンもしくはストレプトアビシン）など）、治療用もしくは診断用部分（例えば、放射性、細胞障害性、もしくは薬学的に活性な部分）、または特定用途（例えば、ヒト対象などの対象への投与、または他の*in vivo*もしくは*in vitro*用途）に対するポリペプチドの適正性を向上させる分子を含むことができる。

【0095】

そのような例の1つにおいて、ポリペプチドは、関節軟骨組織と特異的に結合するリガンドを用いて、例えば、WO 2008063291及び/またはRothenfluh et al., Nature Materials 7:248 (2008)に開示されるとおりに誘導体化される。ポリペプチドの誘導体化に使用可能な分子の例として、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）及びポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。ポリペプチドのアルブミン結合誘導体及びPEG化誘導体は、当該分野で周知の技法を用いて調製することができる。1つの実施形態において、ポリペプチドは、トランスサイレチン（TTR）またはTTR変異体と結合しているか、いずれにしろ連結している。TTRまたはTTR変異体は、例えば、以下からなる群より選択される化学物質で、化学修飾することができる：デキストラン、ポリ(*n*-ビニルピロリドン)、ポリエチレングリコール、プロプロビレングリコール共重合体、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、及びポリビニルアルコール（米国特許出願第20030195154号）。

10

20

30

40

50

【0096】

組成物

本発明は、有効量の本発明のポリペプチド産物（すなわち、T I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体）を、T I M P - 3 療法（すなわち、T I M P - 3 内因性レベルの上昇または内因性T I M P - 3 の活性の向上が有用な症状）に有用な薬学上許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、及び／またはキャリアとともに含む医薬組成物を含む。そのような組成物は、様々な緩衝剤含有量（例えば、トリスH C 1、酢酸化合物、リン酸化合物）、p H、及びイオン強度の希釈剤；添加剤、例えば界面活性剤及び可溶化剤（例えば、T w e e n 8 0、ポリソルベート8 0）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール）、ならびに增量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）など；重合体の共有結合付加物、例えばポリエチレングリコールがタンパク質に付加したもの（上記のとおり、例えば、米国特許第4,179,337号を参照、これは本明細書により参考として援用される）；材料を、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの重合体化合物の粒子状製剤に、またはリポソームに組み込んだものを含む。そのような組成物は、T I M P - 3 結合タンパク質の物理的状態、安定性、*in vivo* 放出速度、及び*in vivo* 排出速度に影響を及ぼすだろう。例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 8 t h E d . (1 9 9 0 , M a c k P u b l i s h i n g C o . , E a s t o n , P A 1 8 0 4 2) p a g e s 1 4 3 5 - 1 7 1 2 を参照、これは本明細書中参考として援用される。

10

20

30

40

【0097】

一般に、本発明のポリペプチドの有効量は、レシピエントの年齢、体重、状態、または疾患の重症度によって決ることになる。前出のR e m i n g t o n s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 6 9 7 ~ 7 7 3 ページを参照、これは本明細書中参考として援用される。典型的には、約0.001g / 体重1kg～約1g / 体重1kg（または1mg～1000mg）の投薬量を用いてもよく、しかし、当該分野の医師には当然ながら、それより多くても少なくともよい。外用使用または関節内使用など、局所的（即ち、非全身的）使用の場合、投薬は約0.001g / cm²～約1g / cm²であってもよい。E C M 分解及び／または有害な心臓組織リモデリングを減少または阻害するという文脈では、心筋への直接注射（または単回投与で構成される注射が一連のものとして行われる）は、任意選択で、T I M P - 3 ポリペプチドを1mg～50mg（例えば、3mg～40mg、5mg～30mg、または10mg～25mg）含む。投薬は、1日に1回または複数回でも、それより少ない頻度でもよく、本明細書中記載されるとおりの他の組成物と併用してもよい。T I M P - 3 変異体、ムテイン、または誘導体の投与は、必要に応じて、1週間に1、2、3、4、5、6、または7日行われてもよい。あるいは、T I M P - 3 変異体、ムテイン、または誘導体は、1週間に1度、2週間に1度、3週間に1度、または4週間に1度（月に1度）投与される。様々な実施形態において、治療レジメンは、T I M P - 3 ポリペプチドの単回投与を含む；例えば、心筋梗塞後またはその最中の治療介入は、心臓への直接単回投与を含んでもよく、これは任意選択で手術中に行われる。なお、本発明は、本明細書中記載される投薬量に限定されない。

【0098】

関連分野では当然のことながら、本発明の分子を含む医薬組成物は、適応症に対して適切な様式で対象に投与される。医薬組成物は、適した技法であればどのような技法で投与されもよく、そのような技法として、非経口技法、外用技法、局所技法、または吸入による技法が挙げられるが、これらに限定されない。注射する場合、医薬組成物は、例えば、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内、または皮下経路を介して、ボーラス注射により、または持続点滴で投与することができる。

【0099】

経皮送達及び移植片またはパッチからの徐放であるような局在化投与、例えば、疾患または損傷の部位での局在化投与が企図されている。他の代替形態として、点眼剤；丸剤、

50

シロップ剤、ロゼンジ剤、またはチューインガムをはじめとする経口製剤；ならびにローション剤、ゲル剤、噴霧剤、及び軟膏などの外用製剤が挙げられる。例えば、関節または筋骨格系への局在化投与として、関節周囲投与、関節内投与、囊内投与、軟骨内投与、滑液内投与、及び腱内投与が挙げられる。呼吸器系への投与として、肺内送達、胸膜内送達、肺内送達、気管内送達、副鼻腔内（*intranasal*）送達、及び気管支内送達が挙げられ、呼吸器系への投与は、例えば、インヘラーまたはネブライザーにより促進することができる。くも膜下腔内送達ならびに脳及び／または神経系への組成物の導入に有用な他の方法もまた、本明細書中企図されており、例えば、硬膜外投与、硬膜内投与、または硬膜周囲投与、ならびに神経周囲投与、仙骨内投与、脳内投与、大槽内投与、及び脊髄内投与がある。

10

【0100】

局所的投与のさらなる例として、手術または他の医療手技と併用しての組織送達が挙げられる。例えば、本発明の医薬組成物は、心臓症候を治療するもしくは寛解させるために行われている手術中に、または心臓カテーテル導入（例えば、経皮的冠動脈形成術または血管形成術）などの手技中に、心臓組織へ投与することができる。送達は、例えば、冠内経路、心臓内経路、心筋内経路、心外膜経路、及び／または経心内膜経路を介したものでもよく、心臓の注射対象領域の心内膜血管造影または電気機械的地図により、あるいは核磁気共鳴画像法（MRI）などの他の技法を使用することにより、誘導されてもよい。組成物はまた、心臓パッチ、冠内カテーテルへの封入を介して、あるいはステントまたは心臓症状に有用な他の装置のコーティングに封入して送達することもできる。適切な送達装置の例は、2014年8月15日出願の米国特許仮出願第62/037,743号に記載されており、これはそのまま全体が本明細書により参照として援用される。

20

【0101】

点眼剤の他、目に本発明の組成物を送達するために、軟膏、クリーム剤、またはゲル剤を使用することも企図されている。目の内部への直接投与は、眼周囲、結膜、角膜内、結膜下、テノン囊下（*subtenons*）、眼球後、眼内、及び／または硝子体内注射または投与により達成されてもよい。これらの技法及び他の技法は、例えば、Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care (2007, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD) に説明されている。

30

【0102】

細胞外基質と組織の動的平衡を維持する目的で、複数の作用剤が協調して作用する。そのような平衡が崩れた状態の治療では、1種または複数の他の作用剤を、本発明のポリペプチドと併用してもよい。こうした他の作用剤は、同時投与されても順次投与されても、それらを組み合わせて投与されてもよい。一般に、こうした他の作用剤は、メタロプロテイナーゼ、セリンプロテアーゼ、基質分解酵素の阻害物質、細胞内酵素、細胞接着修飾物質、ならびに細胞外基質分解プロテイナーゼの発現を制御する因子及びそれらの阻害物質からなるリストより選択してもよい。以下に具体例を列挙するものの、当業者なら、列挙されるのとは他の作用剤、または列挙される作用剤の他の形（組換えDNA技法を介して合成されるもの、ならびに類似体及び誘導体など）をはじめとして、同等な機能を発揮する他の作用剤がわかるだろう。

40

【0103】

細胞外基質分解の防止を向上させるまたはより特異的にすることが望まれる場合には、他の分解阻害物質も使用してもよい。阻害物質は、アルファ2マクログロブリン、妊娠関連タンパク質、オボスタチン、アルファ1-プロテイナーゼ阻害物質、アルファ2-抗プラスミン因子、アプロチニン、プロテアーゼネキシン-1、プラスミノーゲン活性化因子阻害物質（PAI）-1、PAI-2、TIMP-1、TIMP-2、及びTIMP-4からなる群より選択されてもよい。当業者には当然のことながら、他のものも使用してよい。

50

【0104】

細胞内酵素も、本発明のポリペプチドと併用してよい。細胞内酵素も、細胞外基質分解に影響を及ぼす可能性があり、そのような酵素として、リソゾーム(lysosomal)酵素、グリコシダーゼ、及びカテプシンが挙げられる。

【0105】

細胞接着修飾物質も、本発明のポリペプチドと併用してよい。例えば、本発明のポリペプチドを使用して細胞外基質の分解を阻害する前、最中、または後に、細胞外基質への細胞接着を調節したい場合もあるだろう。細胞外基質への細胞接着を示した細胞として、破骨細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、キラーT細胞、及び肥満細胞が挙げられる。細胞接着修飾物質として、「RGD」モチーフまたは類似体を有するペプチド、あるいは模倣アンタゴニストまたはアゴニストが挙げられる。

10

【0106】

細胞外基質分解プロテイナーゼの発現を調節する因子及びそれらの阻害物質として、サイトカイン、例えば、IL-1及びTNF-アルファ、TGF-ベータ、糖質コルチコイド、及びレチノイドが挙げられる。細胞増殖及び/または分化に影響を及ぼす他の増殖因子も使用してよいが、それは、所望の効果が、本発明のポリペプチドを使用して細胞外基質の分解を阻害することであり、増殖因子の細胞作用がそれに協働する場合にである。例えば、炎症の際、細胞外基質の維持(酵素活性の阻害を介して)を望みつつも、好中球の産生を望む場合があるだろう；そのような場合、G-CSFを投与してもよい。他の因子として、エリスロポエチン、インターロイキンファミリーメンバー、SCF、M-CSF、IGF-I、IGF-II、EGF、FGFファミリーメンバー、例えばKGF、PDGF、及び他のものが挙げられる。インターフェロン、例えばインターフェロンアルファ、ベータ、ガンマ、またはコンセンサスインターフェロンなどの活性を追加で望む場合もあるだろう。細胞内作用剤として、Gタンパク質、タンパク質キナーゼC、及びイノシットールホスファターゼが挙げられる。本発明のポリペプチドの使用は、炎症治療に関する1種または複数の作用剤とともに治療効果を提供する場合がある。

20

【0107】

細胞輸送剤も使用してよい。例えば、炎症は、細胞外基質の分解、及び細胞の損傷部位への移動または輸送が関与する。細胞外基質の分解の防止は、そのような細胞輸送を防止する場合がある。したがって、本発明のポリペプチドを、細胞輸送修飾剤のアゴニストまたはアンタゴニストと併用することは、炎症の治療に望ましい場合がある。細胞輸送修飾剤は、内皮細胞表面受容体(E-セレクチン及びインテグリンなど)；白血球表面受容体(L-セレクチン)；ケモカイン、及び化学誘引物質からなるリストより選択してもよい。炎症に関する組成物の総説については、Carlos et al., Immunol. Rev. 114: 5-28 (1990)を参照、これは本明細書中参照により援用される。

30

【0108】

さらに、組成物は、neu分化因子「NDF」を含んでもよく、治療方法は、TIMP-3の投与前、投与と同時に、または投与後にNDFの投与を含んでもよい。NDFは、TIMP-2の産生を刺激することがわかっており、NDF、TIMP-1、-2及び/または-3の組み合わせは、腫瘍の治療に利益をもたらす場合がある。

40

【0109】

本発明のポリペプチドは、検出可能なマーカー物質(例えば、¹²⁵Iでの放射標識化、またはAlexa Fluor(登録商標)[Life Technologies, Grand Island NY]などのフルオロフォアでの標識)またはIR色素[DyLight 800 NHS ester, Thermo Scientific]との会合により「標識」されて、それにより固体組織及び液体試料、例えば血液または尿などの中のTIMP-3の検出及び定量に有用な試薬を提供してもよい。本発明の核酸産物もまた、検出可能なマーカー(放射標識、及びビオチンなどの非同位体標識など)で標識されてもよく、例えば、ハイブリダイゼーションプロセスに使用して関連遺伝子を同定しても

50

よい。

【0110】

上記のとおり、本発明のT I M P - 3 ポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体組成物は、様々な障害に、幅広い用途を有する。すなわち、本明細書中企図されている別の実施形態は、本発明の組成物、及び任意選択で、細胞外基質の分解が関与する障害の治療用の上記のさらなる組成物の1種または複数を含むキットである。さらなる実施形態は、包装材料及びその包装材料の中にある医薬品を含む製品であり、この医薬品は、本発明のポリペプチド、変異体、ムテイン、または誘導体を含有し、この包装材料は、T I M P - 3について治療での使用を表示するラベルを含む。いくつかの態様において、製品は、T I M P - 3 ポリペプチド（複数可）、変異体（複数可）、ムテイン（複数可）、または誘導体（複数可）を、所望の量（例えば、1~1000mg、1~100mg、1~50mg、または本明細書中開示される他の量のいずれか）で含む。1つの実施形態において、医薬品は、以下からなる群より選択される適応症に対して使用されてもよい：癌、炎症、関節炎（変形性関節症などを含む）、栄養障害型表皮水疱症、歯周病、潰瘍化、肺気腫、骨障害、強皮症、創傷治癒、赤血球欠乏、美容組織再構築、受精または胚着床調節、及び神経細胞障害。この製品は、任意選択で、他の組成物または他の組成物のラベル説明を含んでもよい。

10

【0111】

以下の実施例は、本発明の具体的な実施形態または特長を例示する目的で提供されるものであり、本発明の範囲を制限するものではない。

20

【実施例】

【0112】

実施例 1

この実施例は、T I M P - 3 での1つまたは複数の変異が、哺乳類発現系での発現において、効果を有する場合にその効果を決定する方法を記載する。この実施例は、一般的なベクター及び宿主細胞系について記載するものであるが、多数のベクター及び宿主細胞系が、当該分野で既知であり、本明細書中記載されており、T I M P - 3 配列での特定の変異が組換えタンパク質の発現において効果を有する場合にその効果を決定するのに適している。

30

【0113】

概して述べると、T I M P - 3 をコードするDNAを、通常条件下、発現ベクターに連結し（すなわち、T I M P - 3 をコードするDNAを、発現可能なように、ベクターの他の配列に動作可能に連結する）、適切な哺乳類細胞をこのベクターで形質転換または形質移入する。形質転換または形質移入細胞を、適切な条件下で培養し、組換えタンパク質を発現させて、その量を、定量的 / 半定量的いずれかで、例えば、ウエスタンプロット法またはSDS = PAGEにより、あるいはELISA (R & D Systems, Minneapolis MN) またはFortebio Octet (登録商標) (Palo Alto ForteBio Corp, Menlo Park, CA)などのアッセイを利用してより定量的に評価する。このようにして、哺乳類細胞が持つT I M P - 3 タンパク質、ムテイン、または変異体を発現する能力に対する様々な変異の効果を決定することができる。

40

【0114】

T I M P - 3 ポリペプチドにN結合型グリコシル化部位が導入されるように、または天然のグリコシル化部位が増強されるように、1つまたは複数の変異を起こさせるのであれば、グリコシル化の存在及び / または度合いを評価することが望ましい場合がある。細胞を、上記のとおり形質転換または形質移入し、半定量的測定方法（例えば、ウエスタンプロット法）を用いて、N結合型グリコシル化の組み込みが成功しなかったか、部分的に組み込まれたか、それとも十分組み込まれたかを決定することができる。

【0115】

実施例 2 :

この実施例は、T I M P - 3 での1つまたは複数の変異が、ヘパリン非依存性の上昇を

50

もたらすかどうかを決定するのに使用される方法を記載する。細胞を、形質転換または形質移入し、ヘパリン存在下または不在下で培養する。ヘパリンを様々な量で加えて、ヘパリン依存性の程度を半定量的にわかるようにすることができる。ついで、様々な条件下で発現するT I M P - 3 タンパク質、ムテイン、または変異体の量を測定し、比較することによって、細胞外基質からT I M P - 3 タンパク質、ムテイン、または変異体を放出するにヘパリンを必要とするかどうか、または必要とされるヘパリンの量が減少するかどうかに対して、特定の変異が何かしら効果を有するかどうかを決定する。

【0116】

上記の方法を使用して、様々なT I M P - 3 ムテインのヘパリン依存性を求めた。C H O K 1 細胞を、T I M P - 3 またはT I M P - 3 ムテインを產生するように安定的に形質移入した（ピューロマイシンで選択した）。細胞生存度が90%超に到達したら、細胞を產生培地に播種して、ヘパリン存在下または不在下で（上限500 μg / mLまで）6日間培養した。T I M P - 3 タンパク質の量を、S D S - P A G E (4~20%のトリス-グリシン；非還元+ヨードアセトアミド)で測定した。代表的なデータを、図1~3に示す。

10

【0117】

ヘパリン不在下では、F c と融合したT I M P - 3 断片を含む融合タンパク質の発現は、培養培地で検出されなかった。図1、レーン5。培養培地に補充されるヘパリンの量が増えるにつれて、培養培地で検出される融合タンパク質もそれに応じて増加した。図1、レーン6~9。

20

【0118】

グリコシリ化部位の導入は、T I M P - 3 ムテインのヘパリン依存性に影響を及ぼした。F c と融合したT I M P - 3 変異体 [H 7 8 N / Q 8 0 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / R 1 3 8 T] 及び [K 4 5 N / V 4 7 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / G 1 7 3 T] を、ヘパリン不在下でC H O K 1 細胞において產生させた。T I M P - 3 ムテインの発現は、インキュベーションから6日後に検出され、これは、ヘパリンに対する依存性が低下したことを示す。図2を図1と比較のこと。m g / mL (Fortebioタンパク質A)で見積もった発現を、表1に記載する。

【0119】

【表1】

30

T I M P - 3 ムテイン	レーン	推定発現量
[K 4 5 N / V 4 7 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / G 1 7 3 T] - F c G 1	6	9 5
[K 4 5 N / V 4 7 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / G 1 7 3 T] - IgG1Fc + EPKSS 融合体	7	8 9
[H 7 8 N / Q 8 0 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / R 1 3 8 T] - F c G 1	8	1 1 3
[H 7 8 N / Q 8 0 T / K 9 4 N / E 9 6 T / D 1 1 0 N / K 1 1 2 T / R 1 3 8 T] - IgG1Fc + EPKSS 融合体	9	1 1 7

40

【0120】

ヘパリン依存性は、融合パートナーの選択によっても影響される。F c 融合とは異なり、天然型T I M P - 3 断片 (AA1-144) とヒト血清アルブミン (H S A) の融合は、ヘパリン依存性を低下させた。図3は、N-T I M P - 3 - H S A 融合体の強固な発現を示す。同様に、T I M P - 3 変異体 [F 5 7 N / K 4 5 S] とH S Aの融合は、ヘパリン不在下でタンパク質の強い発現をもたらし、一方F cとの融合 (H S Aの代わりに) は

50

、ヘパリン依存性を抑制しなかった。

【0121】

この実施例は、本明細書中記載されるT I M P - 3 ムテインが、培養培地での產生に関して、ヘパリン依存性の低下を示すことを実証する。

【0122】

実施例3：

この実施例は、蛍光定量方法を用いてMMP活性を測定するMMP阻害アッセイを記載する；他の方法も当該分野で既知である。例えば、消光されたMMPサブタイプ5-FAM/QXL520蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)ペプチド基質を、活性化MMPサブタイプまたはサブタイプ特異的触媒領域によって切断すると、蛍光シグナルが増加する。多数の様々なMMPに対するFRETペプチドが、例えば、Anaspec(Fremont、CA)またはR&D Systems(Minneapolis、MN)から入手できる。TIMP-3タンパク質は、本明細書中使用される場合、天然型TIMP-3、あるいはTIMP-3ムテイン、変異体、または誘導体、いずれであってもよい；試験対象のタンパク質は試験分子と称する。

10

【0123】

MMP2活性アッセイについては、ヒトプロMMP2(Anaspec、Fremont、CA)を、1mMの酢酸4-アミノフェニル水銀(APMA、Anaspec、Fremont、CA)を用いて37℃で1時間活性化し、それから、黒色384ウェルOptiplate(PerkinElmer、Waltham、MA)にて、37℃で、種々の濃度の試験分子に対して、納入業者から提供されたアッセイ緩衝液中で、MMP2感応性5-FAM/QXL520 FRETペプチドとともにインキュベートする。2時間インキュベーション後、反応プレートからの蛍光シグナルをEnVisionマルチラベルマイクロプレートリーダー(PerkinElmer、Waltham、MA)にて、励起(490nm)及び発光(520nm)で測定する。GraphPad Prism 5.0(GraphPad、SanDiego、CA)で、相対蛍光単位(RFU)のデータを試験した試験分子濃度に対してプロットして、半最大抑制定数(IC50)を推定する。

20

【0124】

MMP9活性測定については、ヒトMMP9の触媒領域(Anaspec、Fremont、CA)を、黒色384ウェルOptiplate(PerkinElmer、Waltham、MA)にて、37℃で、MMP9感應性5-FAM/QXL520 FRETペプチド及び種々の濃度の試験分子とともにインキュベートする。2時間インキュベーション後、蛍光シグナルを、EnVisionマルチラベルマイクロプレートリーダー(PerkinElmer、Waltham、MA)にて、励起(490nm)及び発光(520nm)で測定する。GraphPad Prism 5.0(GraphPad、SanDiego、CA)で、相対蛍光単位(RFU)のデータを試験した試験分子濃度に対してプロットして、半最大抑制定数(IC50)を推定する。

30

【0125】

MMP13活性については、試験分子をアッセイ緩衝液(20mMのトリス、10mMのCaCl₂、10uMのZnCl₂、0.01%のBrij35(Calbiochem/EMD、SanDiego、CA)、pH7.5)中滴定し、黒色ポリスチレン96または384ウェルアッセイプレート(Griener Bio-One、Germany)に添加する。活性MMP13(Calbiochem/EMD)をアッセイ緩衝液に希釈し、試験分子滴定液に加え、最終体積50マイクロLにて室温で10分間インキュベートする。あるいは、プロMMP-13(R&D Systems、Minneapolis、MN)を、APMAを用いて37℃で2時間活性化し、アッセイに使用する。McA-PLGL-Dpa-AR-NH₂蛍光発生MMP基質またはMcA-KPLGL-Dpa-AR-NH₂蛍光発生ペプチド基質(R&D Systems)などの蛍光発生基質を調製し、MMP-13酵素/huTIMP-3/試験分子溶液に添加する。

40

50

MMP-13活性を、例えば20分間、Molecular Devices蛍光プレートリーダー(または等価なもの)を用いて動力学的に測定する。

【0126】

試験されている分子の効果は、MMP酵素活性に対して予想される最大TIMP-3阻害のパーセントで表現してもよい。あるいは、MMP阻害活性の定量的評価は必要でない場合がある; そうではなくて、個々の試験分子を、それがMMPを阻害するかどうかで評価することができる。当業者には当然のことながら、本明細書中概説されるパラメーターは、常用実験の応用により変えることができる。例えば、先に試験されたTIMP-3及び他の材料を用いて予備実験を行い、MMPまたはプロMPPの適切な濃度を決定する。同様に、基質の種類及び適切な濃度も決定することができる。こうして、例えば、MMPを滴定し、先に試験されたMMPのバッチと比較することで、アッセイパラメーターを最適化することができる。さらに、当業者なら、同様なアッセイを利用して、TIMP-3ムテインまたは変異体が持つ、TNFアルファ変換酵素(TACE)をはじめとする他のMMPを阻害する能力に対して、様々なTIMP-3変異の効果があればその効果について、評価することができる。10

【0127】

実施例4:

分子生物学の標準技術を用いて、TIMP-3の多くのムテインをコードする核酸を製造し、実質的に先に記載したとおりに、哺乳動物の細胞中で発現させた。コードされたTIMP-3ムテインの発現に対する変異の効果を評価した。行った変異のリストは以下を含む: K45N; V47T; K50N; V52T; P56N; F57N; G58T; H78N; Q80T; K94N; E96T; D110N; K112T; R138T; G173T; 及びそれらの組み合わせ。20

【0128】

この表は、哺乳類細胞中に実際に発現した多くのTIMP-3ムテインで得られた、発現及びMMP阻害の結果をまとめたものである。発現レベルの増加は、野生型TIMP-3について観測されるものと比較して発現が何倍増加したかで示しているが、この増加は、ウェスタンプロット法またはSDS-PAGEクーマシー染色ゲルの使用を通じて定性的に、または、TIMP-3を捕捉するのに抗TIMP-3抗体(そのような抗体は、例えば、EMD Millipore、Billerica、MA: AbCam(登録商標)、Cambridge、MA:、またはR&D Systems、Minneapolis、MNから公に入手できる)を使用して、Fortebio Octet(登録商標)読み取りで測定されるとおりに発現力値の測定を通じて、求める。30

【0129】

【表2】

変異体	# E G	H I	力価	M M P 2	M M P 9	T A C E
K45N、V47T、P56N 、G58T、Q126N、R1 38T (配列番号3)	4	依存 性	+	n d	n d	n d
K45N、V47T、P56N 、G58T、K94N、E96 T、R138T (配列番号4)	4	非依 存性	++ ++	1	9	なし
K45N、V47T、P56N 、G58T、R138T、G1 73T (配列番号5)	4	n d	-	n d	n d	n d
K45N、V47T、F57N 、K94N、E96T、D11 0N、K112T (配列番号6)	4	非依 存性	++ +	2	59	なし
K45N、V47T、F57N 、K94N、E96T、R13 8T (配列番号7)	4	非依 存性	++ +	2	38	なし
K45N、V47T、H78N 、Q80T、K94N、E96 T、R138T、G173T (配 列番号8)	5	n d	-	n d	n d	n d
K45N、V47T、K94N 、E96T、D110N、K1 12T、R138T (配列番号 9)	4	n d	-	n d	n d	n d
K45N、V47T、K94N 、E96T、D110N、K1 12T、G173T (配列番号 10)	4	非依 存性	++ +	2	9	2
K45N、V47T、K94N 、E96T、R138T、G1 73T (配列番号11)	4	依存 性	+	n d	n d	n d

10

20

30

40

変異体	# E G	H I	力価	MMP 2	MMP 9	T A C E
K45S、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T (配列番号12)	4	依存性	++ +	3	74	なし
K45S、F57N、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T (配列番号13)	4	依存性	+	n d	n d	n d
K50N、V52T、P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T (配列番号14)	5	非依存性	++ +	2	19	なし
K50N、V52T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T、G173T (配列番号15)	5	非依存性	+	n d	n d	n d
K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T (配列番号16)	4	部分的	++ +	3	10	0.6
K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T、G173T (配列番号17)	5	部分的	++ +	5	21	2
K50N、V52T、K94N、E96T、R138T、G173T (配列番号18)	4	依存性	+	n d	n d	n d
K50N、V52T、Q126N、R138T、G173T (配列番号19)	4	依存性	+	n d	n d	n d
P56N、G58T、H78N、Q80T、K94N、E96T、R138T (配列番号20)	4	部分的	++ ++	2	15	なし
P56N、G58T、K94N、E96T、Q126N、R138T (配列番号21)	4	非依存性	++ ++	2	22	なし

10

20

30

40

変異体	# E G	H I	力価	M M P 2	M M P 9	T A C E
P 5 6 N、G 5 8 T、K 9 4 N 、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T (配列番号 2 2)	4	非依 存性	++ ++	2	2 0	なし
P 5 6 N、G 5 8 T、H 7 8 N 、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、G 1 7 3 T (配列番号 2 3)	4	n d	-	n d	n d	n d
P 5 6 N、G 5 8 T、Q 1 2 6 N、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号 2 4)	4	依存 性	+	n d	n d	n d
H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N 、E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T (配列番号 2 5)	4	n d	-	n d	n d	n d
H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N 、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T (配列番号 2 6)	4	非依 存性	++ +	2	6	0 . 4

1 : 「# E G」 = 操作されたグリコシル化部位の個数

2 : 「H I」は、ヘパリン非依存性を示し、「非依存性」、「依存性」、または「部分的」は、実施例に記載されるとおりである

3 : 「力価」は、野生型と比較した場合の相対力価を示す：「+」：1 ~ 1 0 m g / L、「++」：1 0 ~ 2 5 m g / L、「+++」：5 0 ~ 1 0 0 m g / L、「++++」：> 1 0 0 m g / L

4 : 「M M P 2」は、野生型と比較した場合のM M P 2 阻害活性におけるシフト（すなわち、何倍減少したか）を示す

5 : 「M M P 9」は、野生型と比較した場合のM M P 9 阻害活性におけるシフト（すなわち、何倍減少したか）を示す

6 : 「T A C E」は、野生型と比較した場合のT A C E 阻害活性におけるシフト（すなわち、何倍減少したか）を示す

n d = データなし

【 0 1 3 0 】

本明細書中記載される方法を使用して追加試験を行って、本発明の融合タンパク質を特性決定した。T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) は、M M P 2 及びM M P 9 を阻害した (E C₅₀ は、それぞれ 1 n M 及び 2 . 5 n M)。H S A、F c、及びI g G と融合した T I M P - 3 [H 7 8 N、Q 8 0 T、K 9 4 N、E 9 6 T、D 1 1 0 N、K 1 1 2 T、R 1 3 8 T] (配列番号 2 6) は、阻害活性を維持した：H S A 融合体、M M P 2 の E C₅₀ = 1 . 4 n M、M M P 9 の E C₅₀ = 5 . 1 n M；F c 融合体、M M P 2 の E C₅₀ = 1 3 . 3 n M、M M P 9 の E C₅₀ = 3 2 . 9 n M；I g G 融合体、M M P 2 の E C₅₀ = 1 4 n M、M M P 9 の E C₅₀ = 2 6 n M。比較のため、N - T I M P 3 は、M M P 2 の E C₅₀ = 7 . 6 n M、M M P 9 の E C₅₀ = 1 . 7 n M を示した。H S A と N - T I M P 3 の

10

20

30

40

50

融合体は、MMP2のEC₅₀ = 38.7 nM、MMP9のEC₅₀ = 36.5 nMという結果であり、Fcの融合体は、MMP2のEC₅₀ = 6.9 nM、MMP9のEC₅₀ = 1.6 nMという結果であった。

【0131】

以下の表3に示すものを含むさらなるムテインについて記載する。表中、特定の変異を、見出しにまとめてある；特定の見出しの下にある「x」は、その変異が存在することを示す。「# Gly」という見出しあは、操作されたグリコシル化部位の個数を示し、「記号表示」という見出しあは、計画される変異の組み合わせを示す。これらのムテインは、本明細書中に記載されるとおりに作製及び試験を行うことができる。

【0132】

【表3】

K45 N、V 47T	K50 N、V 52T	H78 N、Q 80T	K94 N、E 96T	D11 0NK 112 T	R1 38 T	G1 73 T	# G l y c	記号表示
	x			x	x	x	4	K50N/V52 T、D110N/ K112T、R1 38T、G173 T
x				x	x	x	4	K45N/V47 T、D110N/ K112T、R1 38T、G173 T
		x		x	x	x	4	H78N/Q80 T、D110N/ K112T、R1 38T、G173 T
x	x	x			x		4	K45N/V47 T、K50N/V 52T、H78N /A80T、R1 38T
x		x		x		x	4	K45N/V47 T、H78N/Q 80T、D110 N/K112T、 G173T

10

20

30

40

K 4 5 N、V 4 7 T	K 5 0 N、V 5 2 T	H 7 8 N、Q 8 0 T	K 9 4 N、E 9 6 T	D 1 1 0 N K 1 1 2 T	R 1 3 8 T	G 1 7 3 T	# G l y c	記号表示
x		x			x	x	4	K 4 5 N/V 4 7 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
	x	x	x			x	4	K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、K 9 4 N /E 9 6 T、G 1 7 3 T
	x	x		x	x		4	K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、D 1 1 0 N/K 1 1 2 T、 R 1 3 8 T
x	x	x		x			4	K 4 5 N/V 4 7 T、K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N /Q 8 0 T、D 1 1 0 N/K 1 1 2 T
	x	x			x	x	4	K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
x		x			x	x	4	K 4 5 N/V 4 7 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
x		x		x	x		4	K 4 5 N/V 4 7 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、D 1 1 0 N/K 1 1 2 T、 R 1 3 8 T

10

20

30

40

K 4 5 N、V 4 7 T	K 5 0 N、V 5 2 T	H 7 8 N、Q 8 0 T	K 9 4 N、E 9 6 T	D 1 1 0 N K 1 1 2 T	R 1 3 8 T	G 1 7 3 T	# G l y c	記号表示
x	x	x		x		x	5	K 4 5 N/V 4 7 T、K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N /Q 8 0 T、D 1 1 0 N/K 1 1 2 T、G 1 7 3 T
x	x	x			x	x	5	K 4 5 N/V 4 7 T、K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N /Q 8 0 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
x	x	x	x			x	5	K 4 5 N/V 4 7 T、K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N /Q 8 0 T、K 9 4 N/E 9 6 T、 G 1 7 3 T
x		x	x		x	x	5	K 4 5 N/V 4 7 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、K 9 4 N /E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
	x	x	x		x	x	5	K 5 0 N/V 5 2 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、K 9 4 N /E 9 6 T、R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
x		x		x	x	x	5	K 4 5 N/V 4 7 T、H 7 8 N/Q 8 0 T、D 1 1 0 N/K 1 1 2 T、 R 1 3 8 T、G 1 7 3 T

10

20

30

40

K 4 5 N、V 4 7 T	K 5 0 N、V 5 2 T	H 7 8 N、Q 8 0 T	K 9 4 N、E 9 6 T	D 1 1 0 N K 1 1 2 T	R 1 3 8 T	G 1 7 3 T	# G l y c	記号表示
	x	x		x	x	x	5	K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、 R 1 3 8 T、G 1 7 3 T
x	x	x		x	x		5	K 4 5 N / V 5 2 T、K 5 0 N / V 5 2 T、H 7 8 N / Q 8 0 T、D 1 1 0 N / K 1 1 2 T、R 1 3 8 T

10

20

30

40

50

【0133】

実施例5

この実施例は、TIMP-3タンパク質が持つHTB-94（商標）細胞（軟骨細胞株、American Type Culture Collection、Manassas、VAから入手可能）と結合する能力を、蛍光標識細胞分取器（FACS）分析により評価するアッセイを記載する。HTB-94（商標）細胞は、LRP1及びECMタンパク質を高レベルで発現し、細胞に結合するTIMP-3ムテインを観測するのに有用である。HTB-94細胞を、37℃で5%CO₂中、HTB-94培養培地（10%ウシ胎児血清[FBS]及び2mMのL-グルタミンを含有する高グルコースDMEM）中で培養する。細胞を、標準組織培養フラスコ中細胞密度2.5×10⁴個/mLで播種して6~12週間培養してから染色し、3~4日ごとにトリプシン処理を通じてフラスコから取り出した後、継代培養する。約16時間後にFACS染色し、HTB-94細胞を、標準組織培養12ウェルプレートに、1ウェルあたり100,000個の細胞で2mL体積のHTB94培地に播種し、37℃で5%CO₂中、インキュベートする。細胞が80~90%集密になってから染色する。

【0134】

約16時間後、HTB94培養培地を吸引して12ウェルプレートから除去し、1ウェルあたり1mLの4C染色緩衝液（リン酸緩衝食塩水[PBS]、2%FBS、0.15%NaN₃）を加える。細胞プレートを氷上で1時間インキュベートする。染色緩衝液を吸引して、TIMP-3のHIS-Mycタグ付タンパク質（天然型TIMP-3またはTIMP-3変異体いずれか）を染色緩衝液で80μg/mLに希釈したものを、0.9mL/ウェル加える；同体積の緩衝液のみを、陰性対照ウェルに加える。細胞プレートを氷上で30分間インキュベートし、吸引し、1mL/ウェルの染色緩衝液で2回洗浄する。2回目の洗浄後、緩衝液を吸引し、マウス抗pentaHIS AlexaFluor488結合抗体（Qiagen、Valencia、CA）を染色緩衝液で20ug/mlに希釈したものを、0.9ml/ウェル加える。これと並行して、無関係のmIgG₁ AlexaFluor488結合抗体（eBioscience、SanDiego、CA）陰性対照染色試薬を染色緩衝液で20μg/mlに希釈したものを、並行して、既知の結合剤TIMP3-HIS-Myc（例えば、K45S、F57N、配列番号23）で染色した複写ウェルに加える。

【0135】

細胞プレートを、光から保護しながら氷上で30分間インキュベートし、吸引し、1mL / ウエルの染色緩衝液で2回洗浄する。2回目の洗浄後、緩衝液を吸引し、1ウェルあたり1mLの細胞解離緩衝液（酵素を含まず、PBS、カタログ#13151-014；Life Technologies、Grand Island NY）を加える。細胞プレートを37℃で5分インキュベートし、細胞を4mLのFACS試験管に移す。プレートのウェルを1mL / ウエルの25%のPBSですすぎ、すすいだ液を、細胞解離緩衝液に入った細胞が入っているFACS試験管の対応するものに加える。試験管を1000RPMで5分遠心して、細胞ペレットを形成させ、吸引する。細胞を300μLの4%パラホルムアルデヒド含有PBS(PFA)に再懸濁させる。これは、FACSを行うまで、光から保護しながら4℃で貯蔵してもよい。

10

【0136】

TIMP3染色から2日以内に、例えば、Becton Dickinson FACS Caliburにて、Alexa Fluor 488蛍光を検出するのにFL1を使用して、8000固定HTB94細胞イベントを獲得する。前方散乱(FSC)検出器の電圧をE00で設定し、側方散乱(SSC)検出器の電圧を316で設定する。併用することで、これらの検出器は、細胞から反射される光を「前方散乱」とび「側方散乱」として測定し、これにより、HTB-94細胞ゲートを定義することができ（「ゲート設定される」とも称される）、そして細胞の大きさ及び粒度に基づいて試験管中の非細胞材料から分離することができる。FL1検出器の電圧は、370で設定する。分析は、例えば、FlowJo vX.0.6を用いて行う。

20

【0137】

上記の方法を使用して、TIMP-3[K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T]（配列番号10）は、HTB-94（商標）細胞と弱く結合しただけであり、TIMP-3[K45S、F57N、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]（配列番号12）、TIMP-3[K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]（配列番号16）、TIMP-3[P56N、G58T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]（配列番号22）、及びTIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]（配列番号26）は、HTB-94（商標）細胞と結合しなかったと判定された。

30

【0138】

また、TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]（配列番号26）はLRP1と結合しないと判定された。細胞外基質成分（HTB-94細胞との結合が減少することにより示されるとおり）及びLRP-1スカベンジャータンパク質への結合が減少することは、ヘパリンへの依存を低下させることにより産生を単純化し、収率を改善し、さらにin vivoでの分子の利用度を向上させる。これらは全て、これまでのTIMP-3ポリペプチドにまつわるTIMP-3産生及び治療の困難を解決する。すなわち、本明細書中記載されるTIMP-3ムテインは、これまでに同定されたTIMP-3ポリペプチドを超える独自の利点を提供する。

40

【0139】

実施例6：

この実施例は、本明細書中記載されるTIMP-3ムテインの薬物動態性質を記載する。

【0140】

頸静脈にカニューレ挿入したPrague Darleyラット(200g~300g、Charles River Labs、San Diego、CA)を、5%イソフルランで麻酔してから、頸静脈を通じてTIMP-3タンパク質(3~6mg/kg)を投与した。5分~72時間の各所望の時点で、血液試料(0.2mL)を、EDTA処理したシリング管に採取し、遠心して血清と血球に分離した。収集した血清試料を、Gyr

50

os (Gyrolabs、Uppsala、Sweden)で、捕捉抗体としてTIMP-3特異的モノクローナル抗体(10A7、Amgen)及び検出抗体として抗ペントヒスチジン抗体(Qiagen、Alameda、CA)または抗Fc抗体(Amgen)を用いて、いずれかの免疫アッセイにより分析した。さらに、TIMP-3特異的断片を、LC-MS/MS方法により定量した。血清試料(25 μL)を、TIMP-3特異的10A7捕捉抗体とともにインキュベートしてから、37℃で一晩トリプシン消化を行った。ペプチドで作製した標準曲線から外挿することにより、TIMP-3痕跡ペプチド断片(WDQLTLSQR及びTQYLLTGR)を定量した。

【0141】

【表4】

10

TIMP-3ポリペプチド	排出(mL/時間/kg)	半減期($t_{1/2}$ 、時間)	Vss (mL/kg)
TIMP-3 [H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]	48±3	3.8±0.2	134±16
TIMP-3 [K45S、F57N]	189±23	1.1±0.1	71±7
TIMP-3 [K45S、F57N] -ヘテロFc融合体	45±0	13.6±3.5	208±20

20

【0142】

N結合型グリコシル化部位の導入は、TIMP-3ムテインの半減期を延長させるとともにVssを向上させ、その排出は減少させた。TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T](配列番号26)は、これよりN結合型グリコシル化部位が少ないTIMP-3[K45S、F57N]と比較して、実質的に改善された薬物動態性質を示した。半減期延長部分とTIMP-3[K45S、F57N]との融合体(ヘテロFc融合体)は、Fc部分を持たないTIMP-3[K45S、F57N]と比較して、実質的に改善された薬物動態性質を示した。

30

【0143】

全身半減期もまた、同様な方法を用いて求めたところ、TIMP-3[K45N、V47T、P56N、G58T、K94N、E96T、R138T](配列番号4)(2.7時間)、TIMP-3[K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T、G173T](配列番号17)(2時間)、TIMP-3[K45N、V47T、K94N、E96T、D110N、K112T、G173T](配列番号10)(1.4時間)、及びTIMP-3[K50N、V52T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T](配列番号16)(2時間)であった。TIMP-3ムテインは、天然型TIMP-3及び天然型TIMP-3のN末端ドメインと比較して延長された全身半減期を実証した(それぞれ0.8時間)。

40

【0144】

曲線下面積(AUC; 時間 * μg/mL)を、TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]及びTIMP-3[K45S、F57N]について調べた。TIMP-3ポリペプチドを3mg/kgで静脈内ボーラス注射してラットに投与した。AUCは、TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]では62.5±4.0であったのに対し、TIMP-3[K45S、F57N]では16.0±1.9であった。TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]は、TIMP-3[K45S、F57N]と比較して、排出及びin vivo接触に改善を示した。

50

【0145】

実施例7：

この実施例は、臨床上許容される動物モデルでのT I M P - 3ポリペプチドの代表的なin vivo試験を記載する。T I M P - 3及びT I M P - 3ムテインを、ブタまたはラットの心臓に投与して、半減期及び心機能に対する効果を求めた。

【0146】

成熟したヨークシャーブタ(25~30kg)を気候順化させ、I A C U Cプロトコルに従って術前処置で取り扱った。右大腿動脈を包含する領域を、滅菌様式で準備し、大腿動脈の主枝を手術で露出させた。カテーテルointロデューサー(6F Input Introducer Sheath, Medtronic)を、動脈に配置して安定させ、最初のヘパリンボーラス(4000単位、I V)とともに外筒を設置し、続いて1時間ごとに追加のボーラス(1000単位、I V)を加えた。蛍光顕微鏡の誘導下(G E O E C 9 6 0 0、U T)、冠動脈血管造影カテーテル/ランチャー(カテーテルを誘導する5F Launcher, Medtronic)を、左冠動脈入口部に設置した。注入ルーメンを含有する血管形成バルーンカテーテル(3mm×10mmのS print er OTWバルーンカテーテル、Medtronic)を、左前下行枝(LAD)の下側部分に配置した。バルーン拡張(12ATMのバルーン拡張圧、E verest 3 0使い捨て拡張デバイス、Medtronic)によりLADを閉塞させ、90分間それを維持した。画像撮影するときは、I R 8 0 0 色素(Dy Light 8 0 0 N H Sエステル、Thermo Scientific)標識したT I M P - 3(5mg)を、バルーン閉塞カテーテルのルーメンを通じて、虚血心筋領域にゆっくりと注入し、それから直ちに再灌流した。ついで、バルーンをしぼませ、カテーテル系を外して取り出した。大腿動脈を結紮して、切開部を閉じた。ブプレノルフィン(0.05mg/kg、I M)を手術前に投与し、ならびにフェンタニルパッチ(25ug/時間、72時間)を手術前に設置するとともに手術3日後にも設置することで、術後の鎮痛を促進した。手術後3日間、さらにリドカイン(1mg/kg、I V)及びアミオダロン(200mgP O)を投与するとともに、この手順が終了するまで毎日アスピリン(81mgP O)を投与した。

10

20

20

【0147】

結紮で心筋梗塞を誘導した後、ブタ心筋に、全長天然型T I M P - 3(F-T I M P 3)及びT I M P - 3のN末端ドメイン(A A 1 - 1 4 4、N-T I M P 3)を直接注入した。ポリペプチドの投与は、心機能を顕著に改善した；梗塞から2週間後、駆出率は、生理食塩水注入と比較して、10%超で改善した。図7を参照。

30

【0148】

画像化手順については、計画されたI / R後の時点(3時間後、1日後、3日後、7日後、及び14日後)、ブタをイソフルラン(5%)で麻酔して、L Vを収穫した。分析用に、全L Vを調製した。頂端、中央(2つの切片)、及び底部領域の全周囲切片を、全載画像化に供して、T I M P - 3分布をL V面積の関数としてコンピューター計算した。切片は氷上に置き、直ちに画像化に供した。各領域からの全周囲L V切片を、エピ照明画像化(Xenogen IVIS、PerkinElmer, Inc, MA)に供した。画像化システムの設定は、I RDye 8 0 0スペクトル(745/800ex/em)に基づいたものであり、シグナルを0.5秒露出窓で収集した。デジタル化画像(Living Imageソフトウェア、PerkinElmer Inc., MA)を面積測定(Image Jソフトウェア、Research Services Branch, MD)に供して、その領域についての合計L V周囲面積を求めた。中央L V領域については、2つ組で測定を行ったため、両方について平均をコンピューター計算した。最終結果を、I R 8 0 0 - T I M P - 3で占有された面積として表すとともに、合計L V領域面積のパーセントとして表した。T I M P - 3分布のさらなる定量的測定については、各領域及び各部からのL V切片(70~100mg)を蛍光/分光法に供した(Li-Cor Odyssey CLX、Li-Cor Biosciences, NE)。収穫した臓器からの切片(約100mg)及び血漿試料(200μL)もまた、96ウェル黒色壁マ

40

50

イクロプレートに置いて、分析に供した。バックグラウンドの補正後、試料ウェルプレートからの分光分析シグナル(20分)を、試料重量(mg)または血漿体積(mL)を基準として正規化した。

【0149】

TIMP-3は、全身投与された場合は、迅速に排出される；静脈内投与された場合のTIMP-3の半減期は1時間未満である。上記のものと同様な画像化手順を使用して、全長天然型TIMP-3(F-TIMP3)及びTIMP-3N末端ドメイン(AA1-144、N-TIMP3)の半減期は、結紮で心筋梗塞を誘導した後の直接注射後の心臓組織では、それぞれ約5日及び3.4日であることが判明した。同様に、冠内カテーテル送達後のTIMP-3ポリペプチドの心臓滞留も長くなることが予想される。なぜなら、TIMP3は、心筋の細胞外基質タンパク質に対する結合親和性が高いからである。TIMP-3[K45S、F57N]の心臓組織半減期は、ブタ心筋梗塞モデルで、約3日であった。図5を参照($t_{1/2} = y = a^* e^{(-b^* x)}$)。TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T](配列番号26)の心臓組織半減期は、約5.43日であった(すなわち、静脈内投与よりも長く、50倍超改善された)。図6を参照。

10

【0150】

ブタについて上記のものと同様な方法を用いて、ラット心臓で心筋梗塞を起こさせ、TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T](配列番号26)を投与して、心機能に及ぼす影響を観察した。ラットには、心筋注射を介して、ビヒクル(PBS、n=9)または4mgのTIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T](n=8)を投与した。注射後3日目及び7日目に、駆出率(EF%)を心エコー法で測定した。TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]を投与された動物は、両測定日とも、対照と比較して有意に向上したEFを示した(対照と比較して20%超の上昇)。図8Aを参照。収縮終期容積(ESV)及び拡張終期容積(EDV)は、心臓リモデリングの指標である；急性心筋梗塞後の左心室(LV)リモデリングを、ベースラインと比較したEDV及びESVの増加の進行により記載する。図8B及び図8Cに示すとおり、TIMP-3[H78N、Q80T、K94N、E96T、D110N、K112T、R138T]は、対照と比較してESV及びEDVを減少させた。

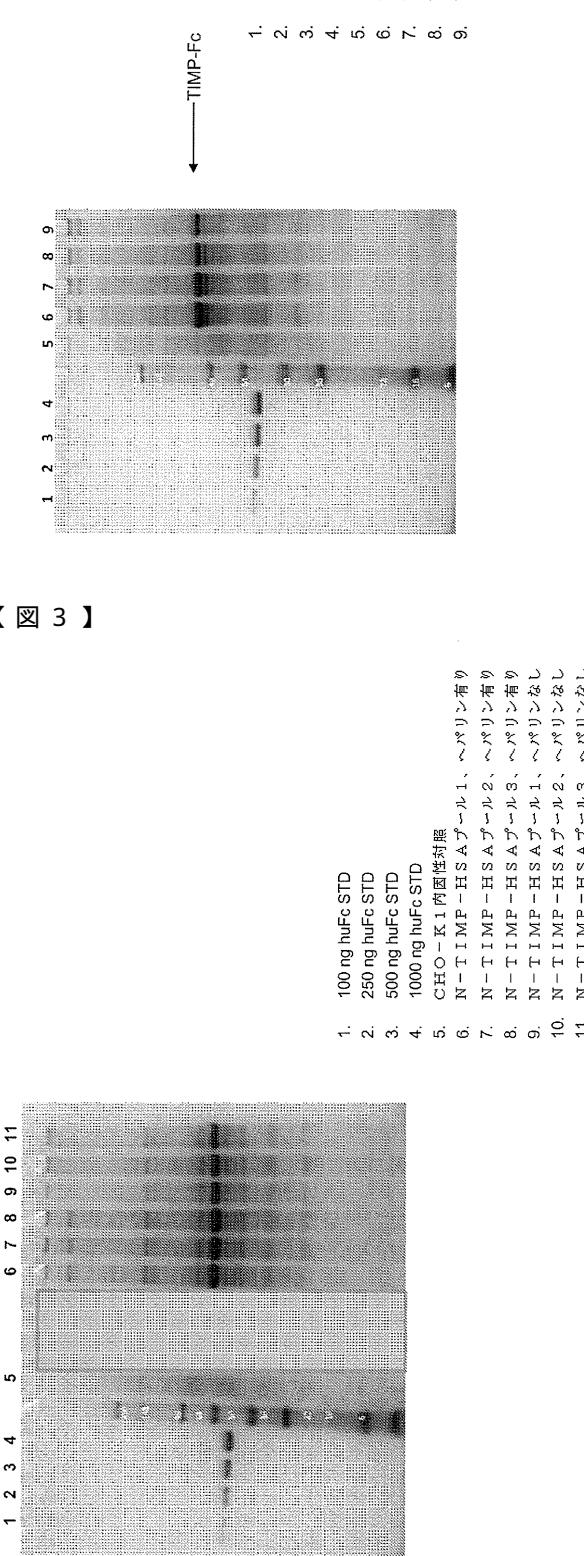
20

【0151】

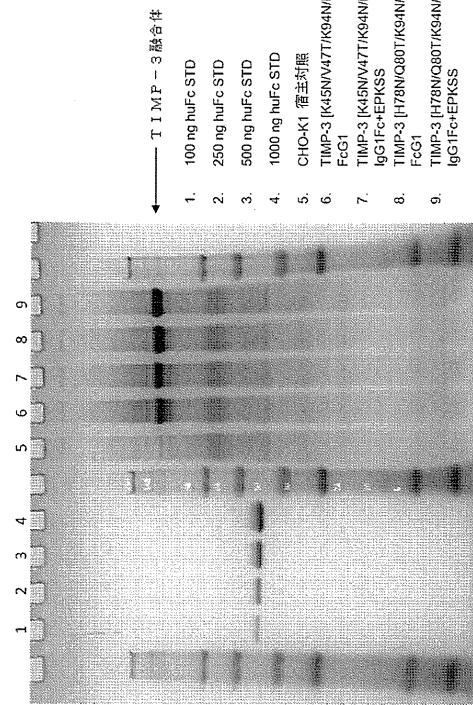
上記のこの結果は、本発明の代表的なTIMP-3ムテインが、天然型TIMP-3と比較して延長された半減期を有し、有害な心臓リモデリングを減少させ、かつ急性心筋梗塞後の心機能を改善することを実証する。

30

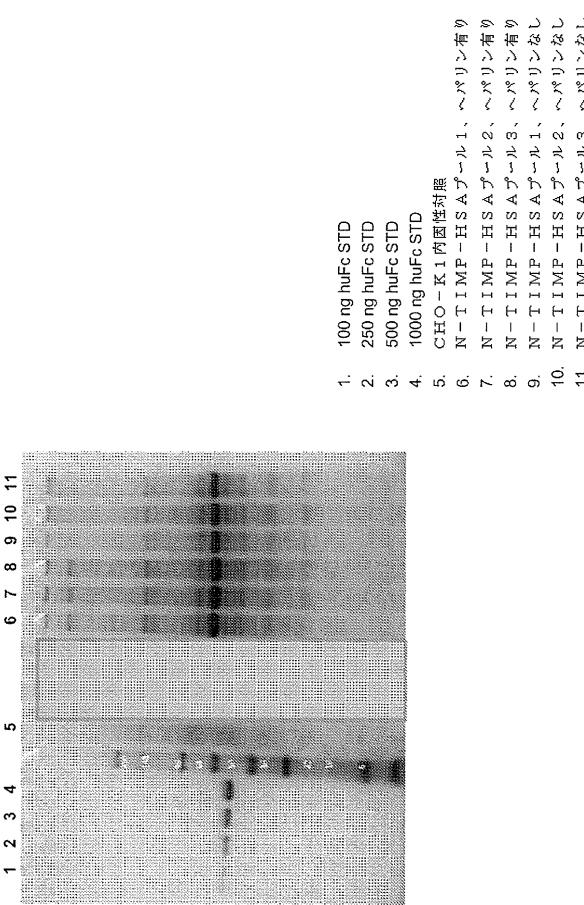
【図1】



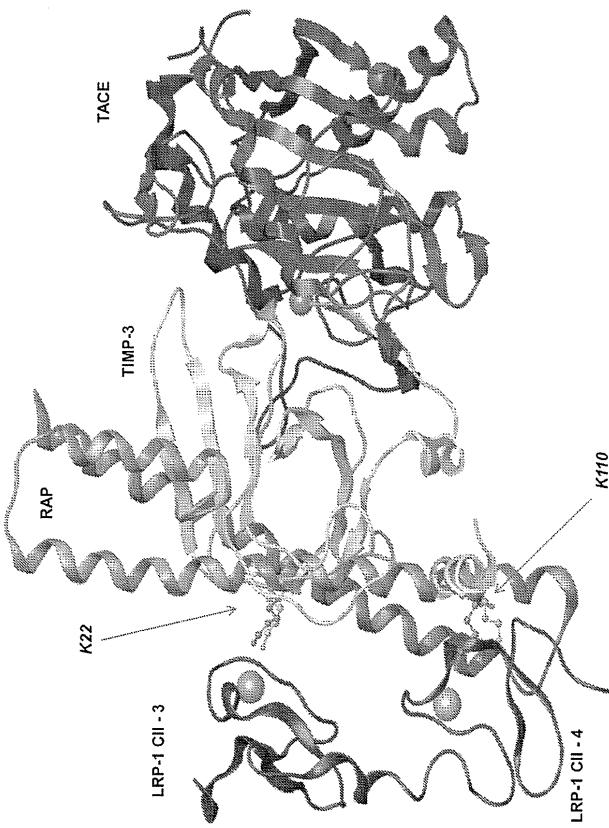
【図2】



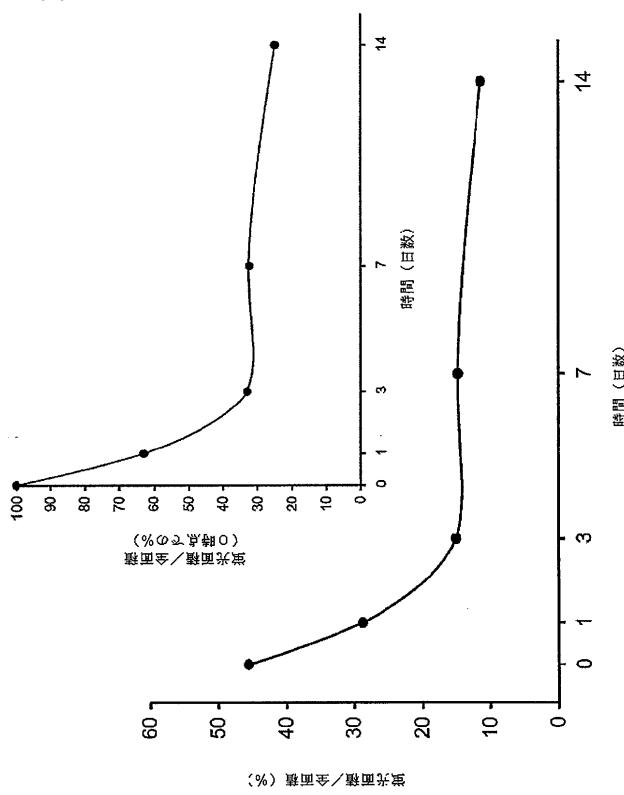
【図3】



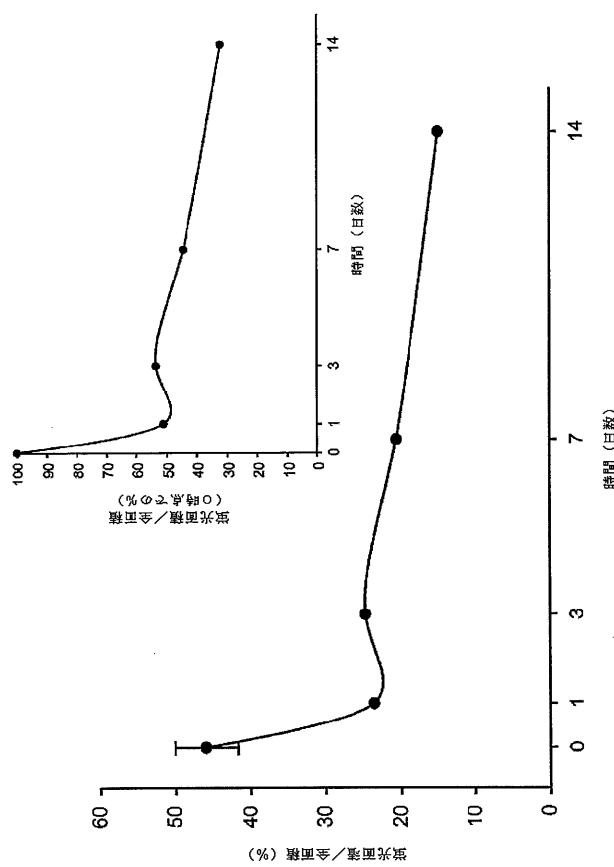
【図4】



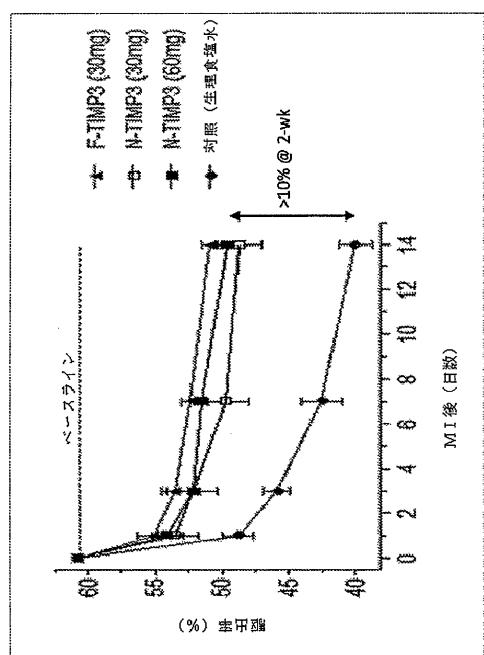
【図5】



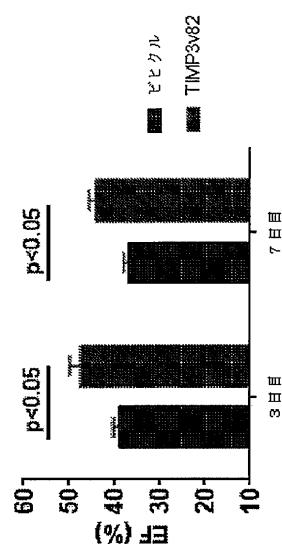
【図6】



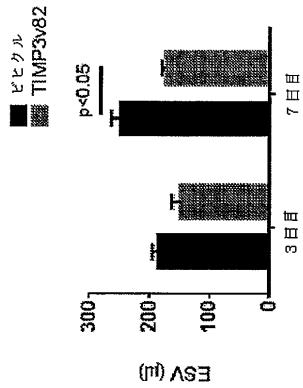
【図7】



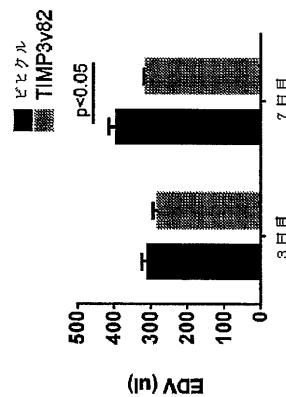
【図8 A】



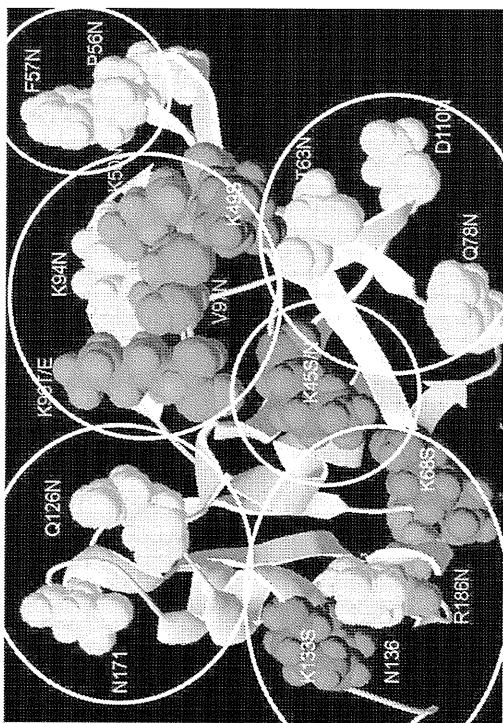
【 図 8 B 】



【図 8 C】



【 図 9 】



【図10A】

配列番号	天竺葵 huTIMP3 cDNA	60	
atggccccctt	ggctcgggcatcategtcgtc	ctgggcgact gggactctggg ggactggggc	60
ggccgggggg	ggacatggctt	ggccggccac ccccaaggag	120
gtgtacccggg	ccaaagggttt	cctttctgcacatc	180
gtttcacacaa	ccaaaggatcc	ctggtaaagg agggggccctt	240
ccatccacca	ccggaaacctt	ccggatcccg ccgttgcgtc	300
cgatgtttttt	ccggatccgtt	ttgtggccata agctggaggat	360
cgatcttcgtt	tggacaggct	caacaaggatc acatgggggtt	420
ctggaggggtt	ggggaaaggct	gtgcggacttt	480
ctgggggtgtt	actggcaatgt	caccccttcc caagcggaaagg	540
aaacgggtttt	tctggacccgt	ctatcttcgtc tactacttcg	600
cactacccgtt	ccggccggca	ttttttttttt accctggatca	660
ccqataataaa	ccatcatcatc	ttccacccaaatccc	633

配列番号 2 天然型 huTMP3 アミノ酸
 HTPMLGLIVLLGGSWSLGDWMAEACTCSPSHQPAQFCNSDIVIRAKVVGKKLVKEGPGFTLVTIKQMNMVIRGFT
 KPTVQYVHTEAEEKSCLQKLEVNKYQYLTTGKQYDGHMVKHCFEVNDRDLSQRIGLMYRHLGCMKCK
 SCYLYPCPCKLNTMDLWVQYGYOSKHYACIRGKGGCSMYRGMAPPDKSISIHTADP

配列番号 3 huTIMP3(K45N, V47T, P56N, G58T, Q126N, R138T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVGKKLWKEGHFTTLVYTIKQHMHYRGFT
 MKHPHQVYIITTEASESCLGKBLKVNQYQLLGDKHGMTCGLNCHEVERWMDMLTSLQRQGLNLYTHLGCNCKIK
 SCYLPCLPCTVTSKNCBLTMILSNNGYPFGPKSKHYACIRQKGGCSYMRWQDMSXINATDP

配列番号 4 huTIMP3(K45N, V47T, P56N, G58T, K94N, R96T, R138T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRANVGKKLWKEGHFTTLVYTIKQHMHYRGFT

配列番号 5 hntMP3 (K45N, V47I, P56N, G58T, R138T, G173T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTSPNSDPOAFACNDIVIRANPTGKXLWKGHPTGLVYTYTICQHMGYRGFT
SCYLWLPQVYIHTAESCTLGMG1KLWBNVNYQYLLTRGVYACIGRKHQYKGGCGCSMYRGAAPDKSIIINATDP

配列番号 6 hntIMP3(K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, D110N, K112T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQPAQFCMSDIVIRANVTGKGLVKEGPNGTLVYIIRQDMHYRGFT
 KMPHQVYIITHEASESCLGILN1HNTMVGQHQLQSXKHAYCIRQKNGCSWYRPAFPDKSNTADP
 SCYLPCLPCFVTSRNKBCLWIDM1LSNVHGTYFGWQQLSKHAYCIRQKNGCSWYRPAFPDKSNTADP

配列番号 7 hntIMP3(K45N, V47T, F57N, K94N, E96T, R128T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQPAQFCMSDIVIRANVTGKGLVKEGPNGTLVYIIRQDMHYRGFT
 KMPHQVYIITHEASESCLGILN1HNTMVGQHQLQSXKHAYCIRQKNGCSWYRPAFPDKSNTADP
 SCYLPCLPCFVTSRNKBCLWIDM1LSNVHGTYFGWQQLSKHAYCIRQKNGCSWYRPAFPDKSNTADP

【 図 1 0 B 】

配列番号 9 huTIMP3(K45M, V47T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPRQDAAFCNSDIVRAINTGKXLVKEGCPFGTVYTIKQMKHMRGET
KMPFHQVYIHTEASELSCLGGLNLTWVQYLLTGRVYNGTHYTLGCNFVERWDOLTSQRKGLNLYTHLGCNCIK
SCYLCVPTFSKNEHCLMTDLMSNEGYPGYOSKHYACIROKGGYCSWYRGAAPDKSIIINATDP

配列番号 10 huTIMP3(K45H, V47T, K94N, E96T, D110H, K112T, G173T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSBSPHQDAFCNCNSDIVRAVNTGKRLVKEGPFPGLVYTYTIQMKMRYGFT
 KMPFHQVYIHTESASLSCLSLGNLHLTVNTTGLRGRVYNGTHYTGLCHFVERWDLQLTSQRKGRLNRYRHLGCNCKIK
 SCYLCPEFLPTSKNECKLTDMLSHFTYPCVGQSXHYACIRGKGGYTMTRGWAPPPDKS1INATDP

配列番号 11 huTIMP3(K45H, V47T, K94N, E96T, R138T, G173T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTSPSHQDAFCNSDIVANRVTGKLLVKEGPFGTVYTIKQMKMYRGFT
KMPFHQVQYIHTEARSESLCGLNLTVNTWQYQILTRGVYDGMHTGLCNFVERDNLQLTSQRKGNNYTHLGCNCKIK
SYCLPCFLPTSKNEKCIWTDLHSHFTYQPKYOSKHYACIR0KGGXSWTRGMAPPDKS11HATDP

配列番号 12 huTIMP3(K4S, F57N, K94N, E96T, D110M, K112T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDQAFCNNSDIVIRASVVGKLVKEGPNGLTVYTIKQWQHMYRGFT
SCVYQWQYQIHEATESLSCGQLNLTVTNGRIVYMTGHLCHFVERWDLQTLSQRKGHLHYTHLGCNCKIK
SCVYQWQYQIHEATESLSCGQLNLTVTNGRIVYMTGHLCHFVERWDLQTLSQRKGHLHYTHLGCNCKIK

配列番号 13 huTIMP3(K45S, F57N, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T)
 XXXXXXXXXXCCCCCCCCCCCCCCCCCTCSPSPHPQQAFCHNSDIVIRASVVGKLVKEPGPNLTVYTIKQMKMYRGFT
 KMMNPVTVYIIEAESLSCCLGNNLTWVQYLITLGRTVYDGKMTGLCNFVRWDTLTSQRKGNYTYHLGCNCKIK
 SCWVTRPCTTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWVTCWV

配列番号 14 huTIMP3(K50N, V52T P56N, G58T, K94N, E96T, D110H, K112T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSPHQDAGFCNSDIVIRAKVVGKGNLTKEGFNTTLVYTIKQHMWYRGFT
KQYQVHPIY1TEAESTSCLGQNLHNYCQYLLTRGVRVYNTMGTYLGLCHFWRVMDLTSQRKGGLNTYTHLCCNCKIK
SCYLPFCVTPSNEKNLTDMLSNLTVFGPQSKHAYCIRIOKGGCSYMRWAPPDKSINLATAD

配列番号 15 hutIMP3(K50N, V52T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T, G173T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDQAFCNSDIVIRAKVVGKLNLTKEGPGTLVYTIKQMRHMYRGFT
KMPNVNTYIHTAESLOGNLTWVNYQQLYLTRGVYDGKMTGLCNFVERNDLQLTSQRKGMLYTHLGNCNKK
SYCLVCPLTFKSNRCLTMDLNUFTYPCYGSOKHYACITRQGGVSYWTRGMAPDKSTNTATDP

配列番号 16 hutIMP3(K50N, V52T, K94N, E96T, D110N, K112T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDQFCNSDIVIRAKVVGKHLTKEGPFGTLVYTIQKMQMRYGFT
KMPHIVQYIIRTEASELSQNLNLTWVHQXQYLTRGVYNGHTYMLCGLNFVERWDQLTSQRKGKLYHLCGCKIK
SCYVLCPTUTSKRHCRLNTWVHQXQYLTRGVYNGHTYMLCGLNFVERWDQLTSQRKGKLYHLCGCKIK
SCYVLCPTUTSKRHCRLNTWVHQXQYLTRGVYNGHTYMLCGLNFVERWDQLTSQRKGKLYHLCGCKIK

配列番号 17 huTIMP3(K50N, V52T, K94N, E96T, D110M, K112T, R138T, G173T)
 XXXXXXXXCCCCCCCCCCCCCTCSPSHQDADFCNSDIVIRAKVVGKNLTKEGPFGTLVITYIKQMMHMYRGFT
 KMPHIVYQIRTEASESLLCGLNLTVNYQVYLGRVYNGHTYVTCGLCNFVERNDQLTLSQRGKLNWTYHLGCNCKIK
 KMPHIVYQIRTEASESLLCGLNLTVNYQVYLGRVYNGHTYVTCGLCNFVERNDQLTLSQRGKLNWTYHLGCNCKIK

【 図 1 0 C 】

配列番号 18 huTIME3(K50N, V52T, K94W, E96T, RL38T, G173T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPHSPQDNDLDIRAKVVGKNLTKEGPFLTVYTIKQMKMRYGFT
 KMPHVQYIYTEASLCLGMLNTVWKYQDTRGVYDGKMYLGCLCNVERMDLTLSQRKGMLNYTYHLGCNCIK
 SCYTLCPFCVFTSKNECLNTDMLSHFTYPGYSRKHACIRQKGGYCSMRGMAPPDKSINATDP

配列番号 19 huTIMP3(K500, V521, Q126, R1387, G1737)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCCTSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKPGPFGLTVYTIKQKMKMYRGFT
 HMLWVQYXHTEASSESLCGLKLWVNKKYQLLTGPKYVGKMGTLCLFVERWDNLTLSQRKGGLNLYTYHLGCNCKIK
 SCYLLLPFCVTTSKHECLWTDMILSHFTTPGYQSKHYACIRQKGGYCMSYRGWAPPDKSIINATDP

配列番号 20 hutIMP3(P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXCTCCTCSPSHQPAQFCNSDIVIRAKVVKVLLKREGNETTIVYTIKQMKMYRGET
PMMNTVYIETRASLSLSCGLNLTWTNNYQVYLTTGVRYDGKMYTGLCNGFWERDOLTSQRGLNMYTSHLGNCKIK
SCYLLPFCVTFSKNECLNTDMLSHLHFPGPYIQSKHYACIRQKGGYCMSHGRWAPPDKSIHATDP

配列番号 21 huTMP3(P56N, G58T K94N, E96I, Q126W, R138T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVKGKVLREGNGFTTLVYTIKQMKMYRGFT
 MKPHVQYIHTEARSSLCGLNLTVTKHRYQYLTLGTRVYDGNNHGTGLCNFVERNDNLILTSQRKGKLNYYTHLGCNCIK
 SCYILPFCFTSKNECLTDIMLSHNFYGPTQSKHYACIRKGGCWSYRGWAPPDRSINATDP

配列番号 22 huTIMP3(P56N, G58T, K94W, E96T, D110M, K112T, R138T)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSSQDAFCNSDIVYRAKVKGLVKEKGNTFTLVVTTIKQW&MYRGFT
 KMPFHQVYIHTEASESLSGLNLTWNVKQYLLTGRVYNGTMTCGLCNFVERNDQLTQSQRKGMLTYHLCGNCKIK
 SCYSLCPFCVTSKNECLWTMDLNFYGPGYQSKHAYICLRQGGYCWSYRGWAPPDKS1INATDP

配列番号 23 butIMP3(P56N, G58T, H78N, Q80T, K94N, E96T, G173T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSSPQDAFCNSDIVRAKVKWGLVREGEHTFTLWVYTIKQMMYRGFT
KMPNVTYI1HTEAESLGCGNLNTVQYLTLTGRVYDGMKTGCLCNFVERMDQLTSLQRKGMLNRYHLGCNCKIK
SYCLPCVFLTSKECNKLTWDLSHFTYPGVQSKHACIROLGGVSYRGMADPKS1INATDP

配列番号 24 huTIMP3(P56N, G58T, Q126N, R138T, G173T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHPODAFCNSDIVARAKVKGKLVKEGNFTTTLVYTIKQWOMYRGFT
SKCPHYQV1HTEASLSCGLGK1LEVKNYQ1LLTGRVYDGHMKTGCLCNFVRWMDNLTLSORGLNLYTHLGNCCKK
SKCPHYLPCFTSKNECLNTDLSHFTPYGKSYACIRGOKGGSWYRMGAAPDKS11ATDP

配列番号 25 huTIMP3(H78H, Q80T, K94M, E96T, R138T, G173T)
 XXXXXXXXCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCSPSPBQD AFCNSDIVIRAKVVGKLVKEGPGTLVYTIKQMKMYRGFT
 KMPNPFVYIHESTEASLSCGLNLTVTGYVQLLTGRVYDGGHMTYGLWNRHMDLTLTSQRKGKLNHYTLHGCKKK
 SYYVLCVTCRKTSEFVWTAGSHTYPCVQGKTYACTPAGCCVCFNWRGMDPQKQGKLNHYTLHGCKKK

配列番号 26 huTlMP3(H78N, Q80T, K94N, E96T, D110M, K112T, R138T)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTCSPSHQDQAFNCNSDIVIRAKVVGKLLVKREGFPGLTVYTIKQMKMYRGFT
KMPNVTYIHTEASESLSCLGNLTWVNKYQYLTLGRVYNGTMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNLYTYHLCGNCKIK

【配列表】

2017532004000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/046992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/81 A61K38/57
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95/05478 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; HAWKES SUSAN P [US]; KISHNANI NARENDRA S [US]; Y) 23 February 1995 (1995-02-23) pages 12,17; claims; figures 1,9; example 8 ----- EP 0 648 838 A1 (AMGEN INC [US]) 19 April 1995 (1995-04-19) the whole document pages 7-8; claims; figure 1; example 1 ----- -/-	1-20
Y		1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

16 October 2015

05/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madruga, Jaime

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/046992

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAN LIU ET AL: "Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites", BIOTECHNOLOGY PROGRESS., vol. 25, no. 5, 27 July 2009 (2009-07-27), pages 1468-1475, XP055221342, US ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.241 cited in the application the whole document -----	1-20
X,P	WO 2014/152012 A2 (AMGEN INC [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) cited in the application the whole document -----	1-20
X,P	US 2014/274874 A1 (KETCHEM RANDAL R [US] ET AL) 18 September 2014 (2014-09-18) the whole document -----	1-20
A	WO 2007/016482 A2 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]; NAGASE HIDEAKI [GB]; BREW KEITH [US]) 8 February 2007 (2007-02-08) the whole document -----	1-20
A	SILBIGER S M ET AL: "Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 141, no. 2, 20 April 1994 (1994-04-20), pages 293-297, XP023540901, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(94)90588-6 [retrieved on 1994-04-20] the whole document -----	1-20
A	BRUECKL W M ET AL: "Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI)", CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 223, no. 1, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 137-142, XP027608002, ISSN: 0304-3835 [retrieved on 2005-06-01] the whole document ----- -/-	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/046992

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LANGTON KEVIN P ET AL: "Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 273, no. 27, 3 July 1998 (1998-07-03), pages 16778-16781, XP002417706, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.273.27.16778 the whole document</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2015/046992**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/046992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9505478	A1 23-02-1995	AU 7827794 A		14-03-1995
		WO 9505478 A1		23-02-1995
EP 0648838	A1 19-04-1995	AT 239079 T		15-05-2003
		AT 412749 T		15-11-2008
		AU 7928194 A		01-05-1995
		DE 69432581 D1		05-06-2003
		DE 69432581 T2		08-04-2004
		DK 0648838 T3		25-08-2003
		DK 1319669 T3		09-02-2009
		EP 0648838 A1		19-04-1995
		EP 1319669 A2		18-06-2003
		EP 2011875 A1		07-01-2009
		ES 2194852 T3		01-12-2003
		ES 2315438 T3		01-04-2009
		HK 1009287 A1		29-08-2003
		HK 1055977 A1		17-07-2009
		IL 111171 A		05-07-2006
		IL 162152 A		03-11-2008
		PT 648838 E		29-08-2003
		PT 1319669 E		07-01-2009
		SI 648838 T1		31-08-2003
		SI 1319669 T1		28-02-2009
		US 6562596 B1		13-05-2003
		US 6683155 B1		27-01-2004
		US 2003143693 A1		31-07-2003
		US 2006286085 A1		21-12-2006
		US 2010010201 A1		14-01-2010
		WO 9509918 A1		13-04-1995
		ZA 9407781 A		17-05-1995
WO 2014152012	A2 25-09-2014	AU 2014236683 A1		01-10-2015
		CA 2906053 A1		25-09-2014
		TW 201446795 A		16-12-2014
		WO 2014152012 A2		25-09-2014
US 2014274874	A1 18-09-2014	NONE		
WO 2007016482	A2 08-02-2007	AU 2006275554 A1		08-02-2007
		CA 2617138 A1		08-02-2007
		CN 101291953 A		22-10-2008
		EP 1910417 A2		16-04-2008
		JP 2009502179 A		29-01-2009
		US 2009318342 A1		24-12-2009
		WO 2007016482 A2		08-02-2007

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
A 6 1 K 38/58 (2006.01)	A 6 1 K 38/58	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 P 21/02	
	A 6 1 P 9/00	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100188271

弁理士 塚原 優子

(72)発明者 オニール, ジェイソン, シー.

アメリカ合衆国 98036 ワシントン州, ブライヤー, 38ティーエイチ プレイス ダブリュ. 23304

(72)発明者 ケチャム, ランダル, アール.

アメリカ合衆国 98296 ワシントン州, スノホミッシュ, 152エヌディーストリート 6332

(72)発明者 リー, タエウォン

アメリカ合衆国 94306 カリフォルニア州, パロ アルト, ナンバー31, グラント アベニュー 425

(72)発明者 チンタルガツ, ビシュヌ

アメリカ合衆国 94587 カリフォルニア州, ユニオン シティ, クイーン アン ドライブ 4402

(72)発明者 スティーブンス, ジェニット, リアン

アメリカ合衆国 91360 カリフォルニア州, サウザンド オークス, シエスタ アベニュー 126

F ターム(参考) 4B064 AG23 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA91X AA93Y AA99Y AB01 AC14 BA02 CA44

4C076 AA06 AA12 AA22 AA24 AA36 AA69 AA72 BB01 BB11 BB13

BB15 BB24 BB27 BB31 CC29 CC41 EE23 EE59 FF63

4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA37 CA18 CA53 DC32 MA13 MA17

MA23 MA28 MA32 MA36 MA47 MA52 MA55 MA57 MA58 MA63

MA66 NA14 ZA01 ZA08 ZA36 ZA37 ZA39 ZA40 ZA45 ZA59

ZA66 ZA67 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB08

ZB11 ZB13 ZB15 ZB35 ZC20 ZC35

4C085 AA25 DD62 EE01 GG02 GG03 GG06 GG08 GG10

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA56 EA22 EA23 FA74