

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036291**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.22

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791688

(22) Дата подачи заявки
2016.01.26

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ PRG4 В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА**

(31) **62/107,799; 62/273,059**

(56) WO-A2-2011019963
WO-A2-2010083239
WO-A1-2009137602
WO-A1-2014115022

(32) **2015.01.26; 2015.12.30**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/US2016/014952**

(87) **WO 2016/123123 2016.08.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛУБРИС ЭлЭлСи; РОД АЙЛЕНД
ХОСПИТАЛ (US)**

(72) Изобретатель:
**Джей Грегори Д., Салливан
Беджамин Д. (US), Шмидт Таннын
Эвери (CA), Эльсаид Халед, Труитт
Эдвард Р. (US), Краветц Роман (CA),
Шмидингер-Ходобска Джоанна,
Ходобски Адам, Фарид Джавед (US)**

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

(57) В изобретении представлены способы применения гликопротеина PRG4, также известного как лубрицин, для снижения, ингибирования или подавления провоспалительных каскадов у пациентов, имеющих риск или страдающих от воспалительного ответа или симптома аллергии, посредством антагонизма CD44, регуляции продукции провоспалительных цитокинов, ингибирования транслокации NF-κB и/или облегчения удаления индуцирующего воспаление клеточного или матриксного дебриса или аллергенов.

B1

036291

036291

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на дату подачи временной заявки США с серийным номером 62/107799, поданной 26 января 2015 г., и временной заявки с серийным номером 62/273059, поданной 30 декабря 2015 г., содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым применениям гликопротеина PRG4 человека или лубрицина. Более конкретно оно относится к применению PRG4 в качестве противовоспалительного средства для снижения или ингибирования воспалительных ответов и для лечения воспалительных состояний.

Уровень техники

Ген протеогликана 4 (PRG4) кодирует мегакариоцитстимулирующий фактор (MSF), а также высокогликозилированный отличающийся вариант по сплайсингу и гликоформы "белка поверхностной зоны", также известного как лубрицин. Белок поверхностной зоны впервые был обнаружен на поверхности эксплантата хряща из поверхностной зоны и идентифицирован в кондиционированной среде. Лубрицин впервые был выделен из синовиальной жидкости, и он продемонстрировал смазывающую способность *in vitro*, аналогичную синовиальной жидкости, на поверхности контакта хрящ-стекло и на поверхности контакта латекс-стекло. Позднее он был идентифицирован как продукт синовиальных фибробластов, и было обнаружено, что его смазывающая способность зависит от O-связанных олигосахаридов β (1-3) Gal-GalNAc в большом муцинподобном домене из 940 аминокислот, кодируемом экзоном 6. Молекулы лубрицина дифференциально гликозилируются, и было описано несколько встречающихся в природе вариантов по сплайсингу. Их в совокупности обозначают в настоящем описании как PRG4. Было показано, что PRG4 присутствует внутри организма на поверхности синовиальной оболочки, сухожилий, суставного хряща, такого как мениск, и в защитной пленке глаза, помимо других областей, и он играет важную роль в смазывании суставов и синовиальном гомеостазе.

До изобретения заявителей PRG4 считался белком только с механическими свойствами, обеспечивающим механическую функциональность, такую как смазывание суставов, сухожилий, хряща, и действующим в качестве механического барьера, ингибирующего межклеточные взаимодействия. Однако, как показано в настоящем описании, заявители обнаружили, что лубрицин обладает свойствами, которые выходят за пределы его способности обеспечивать пограничное смазывание и антиадгезионные свойства. В частности, заявители определили, что PRG4 обладает противовоспалительными свойствами вследствие его способности выступать в качестве лиганда или сигнальной молекулы, участвующей во взаимодействиях лиганд-рецептор, модулируя, например, активацию CD44, транслокацию NF- κ B и опосредуемое цитокинами воспаление.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении используются ранее неизвестные противовоспалительные свойства PRG4, также известного как лубрицин. Таким образом, изобретение относится, например, к способам ингибирования или снижения воспалительных ответов и к способам лечения воспалительных состояний. В основе открытия противовоспалительных свойств PRG4 лежит понимание различных предполагаемых механизмов, посредством которых PRG4 достигает его противовоспалительного эффекта. Эти механизмы были обнаружены заявителями, которые определили, что PRG4 связывает рецепторы CD44, что позволяет ему выступать в качестве антагониста рецептора CD44. В результате, PRG4 способен подавлять провоспалительные ответы, опосредуемые передачей сигнала CD44. Способность PRG4 обеспечивать передачу сигнала CD44 также имеет эффект подавления транслокации NF- κ B. Кроме того, было показано, что введение PRG4 ингибирует продукцию ряда провоспалительных цитокинов, а также модулирует клеточные ответы и пролиферацию вследствие индукции провоспалительных цитокинов (например, TNF- α); что является признаком, уникальным для PRG4, но не для других смазывающих веществ, таких как высокомолекулярная гиалуроновая кислота. Таким образом, PRG4 можно использовать рядом новых путей в терапевтическом и профилактическом контексте для обеспечения противовоспалительного действия посредством его эффекта на каскады передачи сигнала, вовлеченные в воспалительный ответ.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента, включающему введение пациенту PRG4 системно или локально в область, которая является не хрящевой, не костной, не оссальной и не суставной, и не в мочевого пузыря, роговицу глаза или на поверхностную ткань полости рта.

В одном варианте осуществления PRG4 вводят пациенту системно, например, посредством внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрибрюшинного, перорального, ректального, буккального или сублингвального введения или посредством ингаляции.

В другом варианте осуществления изобретения содержащие PRG4 композиции удобно вводить пациентам путем составления PRG4 в виде матричной/каркасной дозированной формы для инъекций/или помещения в определенную область у пациента. Такая содержащая PRG4 композиция может иметь форму состава с контролируемым высвобождением, который способен медленно высвобождать PRG4 в определенной области у пациента. Подходящие матричные/каркасные дозированные формы включают, но не ограничиваются ими, биосовместимые полимеры, полимерные матрицы, капсулы, микрокапсулы,

микрочастицы, диффузионные устройства и липосомы. Другие такие составы по настоящему изобретению включают жидкости, которые при связывании с матриксом или при введении пациенту образуют твердое вещество или гель. В дополнение к таким композициям, составляемым так, чтобы они содержали PRG4, такие композиции также можно составлять так, чтобы они содержали сконструированные рекомбинантными способами клетки, предназначенные для экспрессии PRG4. Содержащие PRG4 композиции можно вводить любым способом, пригодным для направления PRG4 в определенную область у пациента, в том числе путем прямой инъекции или помещения предварительно составленной композиции PRG4 в ходе открытой операции или в ходе лапароскопической или артроскопической процедуры.

В другом варианте осуществления PRG4 вводят пациенту локально, например, местным путем или посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления PRG4 вводят локально в область, выбранную из кожи, почки, легких, печени, раны, такой как ожог кожи или хирургический разрез, щитовидной железы, поджелудочной железы, селезенки, тимуса, яичника, семенника, матки, надпочечника, гипофиза, гипоталамуса, мочеиспускательного канала, предстательной железы, сердца, артерии или сосуда, перикардальной жидкости, головного мозга, желудка. Введение также проводят в отверстия, включающие прямую кишку, нос, ухо, глотку, гортань, трахею. Другие области введения включают язык, заднюю область глаза или область опухоли. Введение также проводят во внутренние органы, включая тонкий кишечник, толстый кишечник, ободочную кишку или пищевод, глотку, гортань, трахею, язык, заднюю область глаза или область опухоли. В некоторых вариантах осуществления область локального введения представляет собой область воспаления или воспалительного ответа у пациента.

В другом варианте осуществления PRG4 вводят системно пациенту, который страдает воспалительным состоянием, выбранным из артрита, остеоартрита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, диабетической ретинопатии, воспаления сетчатки, ретинита, синдрома Шегрена, дегенерации желтого пятна, подагры, псевдоподагры, перикардита или увеита.

В другом варианте осуществления PRG4 вводят системно или локально пациенту, который страдает воспалительным состоянием, выбранным из угревой сыпи; острой недостаточности органов; острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS); болезни Аддисона; аллергического ринита; отторжения аллотрансплантата; очаговой алопеции; болезни Альцгеймера; анафилаксии; аппендицита; астмы; атеросклероза; atopического дерматита; аутоиммунного заболевания, включающего аутоиммунную алопецию; аутоиммунного гипертиреозидизма; аутоиммунного гипопитуитаризма; аутоиммунного плюригландулярного заболевания; болезни Бехчета; повреждения головного мозга; бронхита; злокачественной опухоли; реперфузионного синдрома; кардиоренального синдрома; глютенной болезни; хронического актинического дерматита; хронического обструктивного заболевания легких (COPD); хронической почечной недостаточности; колита; контактного дерматита; болезни Крона; дерматомиозита; диабета; экземы; эмфиземы; отторжения инородного тела; глаукомы; гломерулонефрита; подагры; реакции "трансплантат против хозяина"; болезни Грейвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; септической лихорадки; гепаторенального синдрома; гиперчувствительности или аллергии; миозита с тельцами включения; инфекции вследствие вирусной, грибковой, паразитарной или микробной инфильтрации; воспалительного заболевания кишечника; воспалительного заболевания почек; повреждения после термического или химического воздействия или облучения; синдрома раздраженной кишки; ишемии; воспаления легких; кольцевидной склеродермии; рассеянного склероза; фунгоидного микоза; инфаркта миокарда; некроза; неинфекционного повреждения легких; панкреатита; пернициозной анемии; пневмонии; полимиозита; простатита; псевдоподагры; псориаза; ладонно-подошвенного пустулеза; гангренозной пиодермии; респираторной аллергии; склеродермии; сепсиса; сывороточной болезни; синдрома Сезари; кожной аллергии; инсульта; синдрома системного воспалительного ответа (SIRS); системной красной волчанки; системной склеродермии; заболеваний, обусловленных гиперчувствительностью, опосредуемой Т-клетками; отторжения трансплантата; травмы, в том числе вследствие пулевого ранения, ножевого ранения, автомобильной катастрофы, падения или драки; туберкулеза; язвенного колита; перикардита; крапивницы и витилиго.

В следующем варианте осуществления воспалительный ответ у пациента ассоциирован с воспалительным состоянием, которым страдает пациент.

В следующем варианте осуществления вводимый PRG4 представляет собой рекомбинантный PRG4 человека. В другом варианте осуществления PRG4 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 без сигнальной последовательности. В одном варианте осуществления PRG4 вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания у пациента. В другом варианте осуществления PRG4 вводят в количестве в диапазоне 0,1-4,000 мкг/кг или в качестве покрытия на поверхность ткани, наносимого в виде раствора PRG4, содержащего, например, концентрацию PRG4 от 10 мкг/мл до приблизительно 2 мг/мл.

В одном варианте осуществления снижение или ингибирование воспалительного ответа можно количественно определять по уровню продукции провоспалительного цитокина у пациента. Например, в одном варианте осуществления провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17 α , IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-

32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF- α , TNF- β (лимфотоксин- α), лимфотоксина- β , CXCL31L (фракталкин), CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- γ , VEGF, MCP-1, MCP-3, EGF, GM-CSF, CD40L, CD27L, CD30L, FASL, 4-1BBL, OX40L, TRAIL, FGF-2, GRO, MDC, Rantes, G-CSF, M-CSF, FGF-2, EPO, MCSF, MIP3 α , MG-CSF и GCSF.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента, имеющего воспалительное состояние, причем способ включает введение пациенту PRG4. Воспалительное состояние может представлять собой любое из состояний, упомянутых в настоящем описании.

В одном аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента путем введения пациенту PRG4. Введение PRG4 связывает рецептор CD44 на клетке у пациента, снижает или ингибирует продукцию провоспалительного цитокина у пациента и/или снижает или ингибирует транслокацию NF- κ B в клетке у пациента и тем самым снижает или ингибирует воспалительный ответ у пациента.

В другом варианте осуществления PRG4 вводят локально указанному пациенту в клетки в или около нехрящевой ткани, неосальной ткани, не костной ткани и не ткани роговицы, мочевого пузыря или полости рта, которая является областью воспаления пациента.

В следующем варианте осуществления клетка представляет собой тучную клетку, клетку селезенки, клетку легкого, клетку почки, клетку головного мозга, клетку сердца, клетку печени, злокачественную клетку, клетку кожи, эпителиальную клетку, эндотелиальную клетку, лейкоцит, лимфоцит, нейтрофил, эозинофил, базофил, моноцит, макрофаг, дендритную клетку, фибробласт, мышечную клетку, уретральную клетку, клетку сосудов, нервную клетку, клетку поджелудочной железы, клетку желудка, клетку тонкого кишечника, клетку толстого кишечника, клетку прямой кишки, клетку желчного пузыря, стволовую клетку или клетку щитовидной железы.

В следующем варианте осуществления PRG4 вводят пациенту системно для контакта с синовиоцитом, хондроцитом, остеоцитом, остеобластом, остеокластом, клеткой сетчатки, лимбальной клеткой, клеткой трабекулярной сети, клеткой роговицы, клеткой конъюнктивы, клеткой глаза или офтальмической клеткой.

В другом варианте осуществления независимо от того, вводят ли PRG4 локально или системно, его вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания у пациента. Например, в одном варианте осуществления PRG4 вводят в количестве в диапазоне 0,1-4000 мкг/кг.

В следующем варианте осуществления введение PRG4 снижает или ингибирует провоспалительный цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, EGF, FGF-2, фракталкина, IFN- α 2, GRO, MCP-3, MDC, EPO, IL-13, IL-18, MCSF, MIP-3 α , MG-CSF, IL-7, IL-5, G-CSF, Rantes, IL-17 α или IL-12p70.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования связывания активирующего лиганда с CD44, находящимся на поверхности. Способ включает воздействие на поверхность PRG4 в концентрации, достаточной для связывания CD44 и для ингибирования связывания лиганда. Согласно одному варианту осуществления PRG4 находится на поверхности в количестве, достаточном для связывания CD44, но недостаточном для обеспечения пограничного смазывания. В другом варианте осуществления поверхность представляет собой мембрану клетки млекопитающего, в то время как в другом варианте осуществления поверхность представляет собой детектор поверхностного плазмонного резонанса. В другом варианте осуществления PRG4 представляет собой rhPRG4 (рекомбинантный PRG4 человека) или nhPRG4 (нативный PRG4 человека).

В следующем варианте осуществления поверхность представляет собой поверхность человека. В другом варианте осуществления PRG4 вводят системно. В другом варианте осуществления PRG4 вводят пациенту местно. В другом варианте осуществления PRG4, например rhPRG4, вводят человеку в количестве в диапазоне 0,1-4000 мкг/кг. В другом варианте осуществления PRG4, например rhPRG4, вводят в количестве от 0,1 мкг/мл до 30 мг/мл в небольших объемах 1-100 мкл на дозу. В другом варианте осуществления PRG4 вводят в количестве от 10 мкг/мл до 4 мг/мл в объемах 100 мкл-4 л на дозу, например, в качестве клизмы.

В одном варианте осуществления, когда поверхность представляет собой поверхность человека, человек страдает метаболическим нарушением костей и воздействие PRG4 на рецептор снижает или ингибирует дифференцировку остеокластов. В следующем варианте осуществления человек страдает воспалительным состоянием. Иллюстративные воспалительные состояния приведены в настоящем описании выше. В одном варианте осуществления воздействие PRG4, например rhPRG4, на рецептор уменьшает воспаление или уровень провоспалительного цитокина в области воспалительного состояния.

Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой синовиоцит, тучную клетку, клетку селезенки, клетку легкого, клетку почки, клетку головного мозга, клетку сердца, клетку глаза, клетку печени, злокачественную клетку, клетку кожи, эпителиальную клетку или эндотелиальную клетку. В следующем варианте осуществления клетка представляет собой синовиоцит индивидуума с ревматоидным артритом, клетку поджелудочной железы диабетика, клетку легкого астматика, клетку глаза

индивидуума с инфекцией, ожогом или другим раздражением глаза; эпителиальную клетку бронха или альвеолы индивидуума с туберкулезом или другой легочной инфекцией, или повреждением, или состоянием; клетку легкого индивидуума с кистозным фиброзом; эпителиальную клетку нижнего отдела кишечника индивидуума с колитом или болезнью Крона; клетку кожи индивидуума с псориазом, клетку кожи индивидуума с угревой сыпью; клетку кожи индивидуума после лечения посредством лазерной абляции или эндотелиальную клетку индивидуума с сепсисом. В другом варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку, в то время как в следующем варианте осуществления клетка представляет собой лимфоцит, нейтрофил, фибробласт, злокачественную клетку, макрофаг, дендритную клетку, моноцит, эозинофил или эндотелиальную клетку.

Согласно одному варианту осуществления воздействие на поверхность PRG4, например ghPRG4, обеспечивает антагонизм провоспалительному лиганду CD44. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой гиалуронан (HA), комплекс гиалуронана и происходящего из сыворотки ассоциированного с гиалуронаном белка (HA-SHAP) или матриксную металлопротеиназу (например, MMP-9). В другом варианте осуществления лиганд представляет собой гемопексин, EMMPRIN, соматомедин-B, остеопонтин, ОКТЗ или родственный компоненту белок, такой как С3а, CD3, CD46.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования уровней провоспалительных цитокинов в крови, например, у человека. Способ включает стадию введения PRG4 системно в количестве, достаточном для снижения или ингибирования уровней провоспалительных цитокинов. Иллюстративные провоспалительные цитокины включают IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, IFN- γ , TNF- α , IL1- α , IL-1- β , MCP-1, EGF, FGF-2, фракталкин, IFN- α 2, GRO, MCP-3, MDC, EPO, IL-13, IL-18, MCSF, MIP-3 α , MG-CSF, IL-7, IL-5, G-CSF, Rantes, IL-17 α или IL-12p70.

В следующем аспекте изобретение относится к способу ингибирования транслокации NF- κ B в клетке. Способ включает стадию приведения в контакт клетки, содержащей NF- κ B, с PRG4, где PRG4 связывается с рецептором клеточной поверхности для ингибирования активации каскада передачи сигнала NF- κ B. В следующем варианте осуществления PRG4 ингибирует рецептор TNF- α или рецептор IL-1 на клеточной поверхности.

В другом варианте осуществления, когда клетку приводят в контакт с PRG4, она находится в человеке. В следующем варианте осуществления клетка представляет собой синовиоцит, хондроцит или остецит, в то время как в другом варианте осуществления клетка представляет собой клетку селезенки, клетку легкого, клетку почки, клетку головного мозга, клетку сердца, клетку головного мозга, клетку печени, эпителиальную клетку или эндотелиальную клетку.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А-С представляют собой столбиковые диаграммы, на которых показаны данные, демонстрирующие связывание рекомбинантного протеогликана 4 человека (rhPRG4), высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (HMW HA) и гиалуроновой кислоты средней молекулярной массы (MMW HA) с рекомбинантным рецептором CD44 человека, определенное посредством ТМВ-ELISA при 450 нм. Данные соответствуют среднему значению для 4 независимых экспериментов с тремя экземплярами лунок на группу. На фиг. 1А представлено связывание rhPRG4, HMW HA, MMW HA и витронектина с CD44-Fc IgG1 и Fc IgG1. Звездочкой (*) показано, что поглощение при 450 нм в лунках CD44-Fc IgG1 было более высоким на статистически значимом уровне ($p < 0,001$), чем в лунках Fc IgG1, для rhPRG4, HMW HA и MMW HA. На фиг. 1В показано зависимое от концентрации связывание CD44 с rhPRG4, HMW HA и MMW HA. Связывание CD44 с rhPRG4 было значимо более высоким, чем с HMW HA или MMW HA ($p < 0,001$). Двойными звездочками (**) указано, что связывание CD44 с rhPRG4 было значимо более высоким, чем с MMW HA ($p < 0,001$). На фиг. 1С представлена конкуренция между rhPRG4 (5 мкг/мл) и либо HMW HA, либо MMW HA (от 0,01 до 50 мкг/мл) при связывании с CD44, нанесенным на 96-луночные планшеты для ELISA. Звездочкой (*) показано, что процентное связывание CD44 в лунках HMW HA+rhPRG4 было значимо более низким, чем в лунках rhPRG4 ($p < 0,05$); (**) показывает, что процентное связывание CD44 в лунках MMW HA+rhPRG4 было значимо более низким, чем в лунках rhPRG4 ($p < 0,05$).

На фиг. 2А-В представлено связывание рекомбинантного протеогликана 4 человека (rhPRG4) с рекомбинантным CD44 и конкуренция между rhPRG4 и высокомолекулярной гиалуроновой кислотой (HMW HA) при связывании CD44 при использовании поверхностного плазмонного резонанса. На фиг. 2А представлена сенсограмма, на которой показана зависимость от концентрации ассоциация и диссоциация rhPRG4 (от 300 до 50 мкг/мл) в отношении иммобилизованного CD44-Fc IgG₁. Кривые, изображенные пунктирной линией, соответствуют кривым связывания rhPRG4 с химерным белком CD44, и черная линия представляет собой аппроксимированную модель связывания 1:1. На фиг. 2В представлен график, демонстрирующий относительный ответ, представляющий собой связывание HMW HA, против относительного ответа, представляющего собой связывание rhPRG4. Конкуренция между rhPRG4 и HMW HA при связывании с иммобилизованным CD44-Fc IgG₁. rhPRG4 инъецировали в дозе 300 (1), 250 (2), 200 (3), 150 (4), 100(5), 50(6) и 0 (7) мкг/мл. После диссоциации rhPRG4 HMW HA инъецировали в дозе 50 мкг/мл. По мере возрастания концентрации rhPRG4 последующее связывание HMW HA с CD44 снижа-

лось.

На фиг. 3А-В представлено влияние расщепления сиалидазой-А и О-гликозидазой рекомбинантного протеогликана 4 человека (rhPRG4) на связывание rhPRG4 с CD44. Данные представляют собой среднее значение для 4 независимых экспериментов с тремя экземплярами лунок на группу. На фиг. 3А представлена столбиковая диаграмма, на которой показано связывание rhPRG4, расщепленного сиалидазой-А rhPRG4, расщепленного О-гликозидазой rhPRG4 и расщепленного сиалидазой-А+О-гликозидазой rhPRG4 с CD44. Величины поглощения при 450 для различных групп нормализовывали к величинам поглощения в группе нерасщепленного rhPRG4. (*) указывает на то, что связывание CD44, расщепленным сиалидазой А и расщепленным О-гликозидазой rhPRG4, было значимо более высоким по сравнению с нерасщепленным rhPRG4 ($p < 0,01$). (**) указывает на то, что связывание CD44, расщепленным сиалидазой-А+О-гликозидазой rhPRG4, было значимо более высоким по сравнению с расщепленным сиалидазой-А, расщепленным О-гликозидазой и нерасщепленным rhPRG4 ($p < 0,01$). На фиг. 3В представлена фотография SDS-PAGE rhPRG4, расщепленного сиалидазой А rhPRG4, расщепленного О-гликозидазой rhPRG4 и комбинации расщепленного сиалидазой-А и О-гликозидазой rhPRG4. Гель окрашивали в течение ночи кумасси синим. Расщепление сиалидазой-А и О-гликозидазой приводило к снижению кажущейся молекулярной массы rhPRG4.

На фиг. 4А-В представлено влияние обработки рекомбинантным протеогликаном 4 человека (rhPRG4) и высокомолекулярной гиалуроновой кислотой (HMW HA) на индуцируемую цитокинами пролиферацию фибробластподобных синовиоцитов ревматоидного артрита (RA-FLS). Данные соответствуют среднему значению для 3 независимых экспериментов с тремя экземплярами лунок на обработку. На фиг. 4А представлена столбиковая диаграмма, на которой показано ингибирование индуцируемой цитокинами пролиферации RA-FLS посредством rhPRG4 и HMW HA. (#) указывает на то, что стимулируемые цитокинами RA-FLS имели значимо ($p < 0,001$) более высокое поглощение, чем необработанные клетки. (*) указывает на то, что обработка rhPRG4 (40 и 80 мкг/мл) или HMW HA (40 и 80 мкг/мл) RA-FLS, стимулированных IL-1 β , значимо ($p < 0,05$) снижала клеточную пролиферацию по сравнению с необработанными клетками, стимулированными IL-1 β . (**) указывает на то, что обработка rhPRG4 (20, 40 и 80 мкг/мл) значимо ($p < 0,05$) снижала пролиферацию клеток по сравнению с необработанными клетками, стимулированными TNF- α . На фиг. 4В представлена столбиковая диаграмма, на которой показано ингибирование индуцируемой цитокинами пролиферации RA-FLS посредством rhPRG4 и HMW HA в присутствии и в отсутствие IM7, специфичного к CD44 антитела. (#) указывает на то, что стимулированные цитокинами RA-FLS имели значимо ($p < 0,001$) более высокое поглощение, чем необработанные клетки. (*) указывает на то, что обработка посредством rhPRG4 или HMW HA приводила к значимо более низкой клеточной пролиферации по сравнению с отсутствием обработки IL-1 β или обработкой (rhPRG4 или HMW HA) +IM7 ($p < 0,05$). (**) указывает на то, что обработка rhPRG4 приводила к значимо ($p < 0,05$) более низкой клеточной пролиферации по сравнению с отсутствием обработки TNF- α или обработкой rhPRG4+IM7 ($p < 0,05$), и этот результат не воспроизводился для HMW HA. На фиг. 4С представлена столбиковая диаграмма, на которой изображено ингибирование посредством rhPRG4 индуцируемой TNF- α транслокации NF- κ B в ядро RA-FLS. Транслокация в ядро NF- κ B в группе TNF- α +rhPRG4 была значимо более низкой, чем в группах TNF- α отдельно или TNF- α +rhPRG4+IM7 ($p < 0,001$). Обработка rhPRG4 или ингибитором транслокации NF- κ B MG132 значимо снижала транслокацию NF- κ B в ядро по сравнению с обработкой RA-FLS посредством TNF- α ($p < 0,001$).

На фиг. 5А-С представлено влияние провоспалительных цитокинов на пролиферацию Prg4 $^{-/-}$ и Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитов и эффект rhPRG4. На фиг. 5А показаны микрофотографии флуоресценции Prg4 $^{-/-}$ и Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитов, подвергнутых иммунному окрашиванию с использованием антитела против CD44 (IM7) (зеленый) и DAPI (синий). Усиленная зеленая флуоресценция в Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитах указывает на увеличенную локализацию CD44 по сравнению с Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитами. На фиг. 5В представлена столбиковая диаграмма, на которой показана индуцированная цитокинами пролиферация Prg4 $^{-/-}$ и Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитов. Индуцированная IL-1 β пролиферация Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов была значимо более высокой, чем индуцированная IL-1 β пролиферация Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитов ($p < 0,001$) и индуцированная TNF- α пролиферация Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов ($p = 0,002$). Индуцированная TNF- α пролиферация Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов была значимо более высокой, чем индуцированная TNF- α пролиферация Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитов ($p < 0,001$). На фиг. 5С показана столбиковая диаграмма влияния обработки rhPRG4 на индуцируемую цитокинами пролиферацию Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов в присутствии и в отсутствие IM7. (#) указывает на то, что стимулированные цитокинами Prg4 $^{-/-}$ синовиоциты имели значимо более высокое поглощение по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,001$). (*) указывает на то, что обработка rhPRG4 стимулированных IL-1 β Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов значимо снижала клеточную пролиферацию по сравнению с отсутствием обработки IL-1 β или обработкой rhPRG4+IM7 ($p < 0,001$). (**) указывает на то, что обработка rhPRG4 стимулированных TNF- α Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов значимо снижала клеточную пролиферацию по сравнению с отсутствием обработки TNF- α или обработкой rhPRG4+IM7 ($p < 0,001$).

На фиг. 6 представлена аминокислотная последовательность полноразмерного (не укороченного) PRG4 человека (SEQ ID NO: 1: 1404 остатка). Остатки 1-24 (показаны полужирным шрифтом) соответст-

вуют сигнальной последовательности и остатки 25-1404 соответствуют зрелой последовательности PRG4 человека. Для гликопротеина не требуется, чтобы лидирующая последовательность была в ее активной форме.

На фиг. 7 представлена последовательность нуклеиновой кислоты для гена PRG4 (SEQ ID NO: 2), кодирующего полноразмерный белок PRG4 человека из 1404 а.к.

На фиг. 8А-В представлена активация посредством введения липополисахарида продукции воспалительных цитокинов. На фиг. 8А представлена таблица, демонстрирующая измеренный уровень каждого цитокина, присутствующего в образцах цельной крови после нагрузки физиологическим раствором (контроль) и после нагрузки липополисахаридом. Концентрации различных цитокинов соответствуют среднему значению для определения в двух экземплярах, и они выражены в пг/мл (нг/л). Процентное изменение показано на столбиковой диаграмме на фиг. 8В, и оно основано на сравнении результатов, полученных для стимуляции LPS, с результатами, полученными для контроля в виде физиологического раствора.

На фиг. 9А-В показано подавление лубрицином продукции воспалительных цитокинов. На фиг. 9А представлена таблица, демонстрирующая измеренный уровень каждого цитокина, присутствующего в образцах цельной крови, после нагрузки физиологическим раствором (контроль) и после нагрузки лубрицином. Концентрации различных цитокинов соответствуют среднему значению для определений в двух экземплярах, и они выражены в пг/мл (нг/л). Процентное изменение каждого индивидуального цитокина основано на сравнении дополненного лубрицином образца с контролем в виде физиологического раствора, и оно показано на столбиковой диаграмме на фиг. 9В.

На фиг. 10А-В показано ингибирование посредством введения лубрицина опосредуемой LPS продукции воспалительных цитокинов. На фиг. 10А представлена таблица, демонстрирующая измеренный уровень каждого цитокина, присутствующего в образцах цельной крови, после нагрузки LPS и LPS с лубрицином. Концентрации различных цитокинов соответствуют среднему значению для определения в двух экземплярах, и они выражены в пг/мл (нг/л). Процентное изменение каждого из индивидуальных цитокинов основано на сравнении LPS отдельно и LPS, дополненного лубрицином, и оно показано на столбиковой диаграмме на фиг. 10В.

На фиг. 11А-В показано ингибирование посредством введения лубрицина опосредуемой TNF- α продукции воспалительных цитокинов. На фиг. 11А представлена таблица, демонстрирующая измеренный уровень каждого цитокина, присутствующего в образцах цельной крови, после нагрузки TNF- α и лубрицином с TNF- α . Концентрации различных цитокинов соответствуют среднему значению для определения в двух экземплярах, и они выражены в пг/мл (нг/л). Процентное изменение для каждого из индивидуальных цитокинов основано на сравнении TNF- α отдельно и TNF- α , дополненного лубрицином, и оно показано на столбиковой диаграмме на фиг. 11В.

На фиг. 12А-В показано ингибирование посредством введения лубрицина опосредуемой тканевым фактором (TF) продукции воспалительных цитокинов. На фиг. 12А представлена таблица, демонстрирующая измеренный уровень каждого цитокина, присутствующего в образцах цельной крови после нагрузки TF и лубрицином с TF. Концентрации различных цитокинов соответствуют среднему значению для определения в двух экземплярах, и они выражены в пг/мл (нг/л). Процентное изменение для каждого из индивидуальных цитокинов основано на сравнении TF отдельно и TF, дополненного лубрицином, и оно показано на столбиковой диаграмме на фиг. 12В.

На фиг. 13 представлен график, демонстрирующий уровни EPO, IL-13, IL-10, IL-18, IL-1 α , IL-2, MCSF, IL-1 β , IL-4, IFN- γ , MIP-3 α , GM-CSF, IL-7, TNF- α , VEGF, MCP-1, IL-5, G-CSF, RANTES, IL-6, GRO, IL-17 α и IL-12p70 в образцах сыворотки, полученных от исследуемых мышей, которым проводили внутрисуставное введение рекомбинантного лубрицина человека после хирургической операции (дестабилизация медиального мениска; серые столбики) по сравнению с контрольными мышами, которым проводили хирургическую операцию, но вводили физиологический раствор вместо лубрицина после хирургической операции (белые столбики).

Фиг. 14А-В представляют собой столбиковые диаграммы, демонстрирующие уровни цитокинов, экспрессируемых остеоартритическими и нормальными синовиоцитами человека при воздействии рекомбинантного лубрицина человека. На фиг. 14А представлены концентрации FGF-2, в то время как на фиг. 14В представлены концентрации IL-1Ra.

На фиг. 15 продемонстрировано влияние внутрисуставного введения рекомбинантного протеогликана 4 человека (rhPRG4) на индуцируемое кристаллами урата мононатрия (MSU) изменение давления отдергивания лапы (PWT) у самцов крыс Lewis. Давление отдергивания лапы измеряли с использованием электронного устройства фон Фрея, и данные представлены в качестве процентного изменения от исходных уровней.

Подробное описание

Изобретение, описанное в настоящем описании, основано на открытии ранее неизвестных и недооцененных противовоспалительных свойств PRG4, также известного как лубрицин. В изобретении используются противовоспалительные свойства PRG4 для предоставления ряда новых терапевтических и

профилактических применений PRG4. Например, изобретение относится к способам ингибирования или уменьшения воспалительных ответов и к способам лечения воспалительных состояний.

В то время как воспалительный ответ необходим для борьбы с инфекцией и заболеванием, многие воспалительные состояния являются результатом чрезмерных, неконтролируемых или неоправданных воспалительных ответов. Это происходит в случае, например, аутоиммунных состояний, аллергических реакций, хронических воспалительных состояний и сепсиса. Хотя в некоторых ситуациях воспаление может вызывать хроническую боль и дискомфорт и приводить к низкому качеству жизни, в других ситуациях воспаление может угрожать жизни, как в случае сепсиса. Таким образом, открытие, что PRG4 можно использовать в качестве противовоспалительного средства, например, для смягчения воспаления, когда оно является чрезмерным, неконтролируемым и неоправданным, обеспечивает перспективу для лечения хронических или острых воспалительных состояний и регуляции, снижения или ингибирования уровня ассоциированного с ними воспаления.

Белок PRG4.

PRG4, также называемый лубрицином, представляет собой смазывающий полипептид, который у человека экспрессируется с гена мегакариоцитстимулирующего фактора (MSF), также известного как PRG4 (см. номер доступа NCBI AK131434-U70136). Лубрицин является повсеместно распространенным эндогенным гликопротеином, который покрывает поверхности сочленений в организме. Лубрицин является в высокой степени поверхностно-активной молекулой (например, удерживает воду), которая действует в основном в качестве мощного цитопротекторного, антиадгезивного и пограничного смазывающего вещества. Молекула имеет длинный центральный муцинподобный домен, расположенный между концевыми белковыми доменами, которые позволяют молекуле прикрепиться и защищать поверхности тканей. Ее природная форма у всех исследованных млекопитающих содержит множество повторов аминокислотной последовательности, которые по меньшей мере на 50% идентичны КЕРАРТТ (SEQ ID NO: 3). Природный лубрицин, как правило, содержит множество повторяющихся форм этого повтора, который, как правило, включает остатки пролина и треонина, причем в большинстве повторов по меньшей мере один остаток треонина является гликозилированным. Заякоренные на треонине O-связанные боковые цепи сахаров являются ключевыми для функции пограничного смазывания лубрицина. Боковая цепь, как правило, представляет собой часть β (1-3) Gal-GalNAc, причем β (1-3)Gal-GalNAc обычно имеет на конце сиаловую кислоту или N-ацетилнейраминную кислоту. Полипептид также содержит N-связанные олигосахариды. Ген, кодирующий встречающийся в природе полноразмерный лубрицин, содержит 12 экзонов и встречающийся в природе продукт гена MSF содержит 1404 аминокислоту (включая секреторную последовательность) с множественной гомологией полипептидной последовательности с витронектином, включая гемопексинподобные и соматомединподобные области. Центральное расположенный экзон 6 содержит 940 остатков. Экзон 6 кодирует богатый повторами O-гликозилированный муцин-подобный домен.

Аминокислотная последовательность белкового остова лубрицина может различаться в зависимости от альтернативного сплайсинга экзонов гена MSF человека. Сохранение его качеств в не зависимости от гетерогенности было проиллюстрировано, когда исследователи создали рекомбинантную форму лубрицина, в которой отсутствовало 474 аминокислоты из центрального домена муцина, но которая все еще обеспечивала приемлемое, хотя и сниженное, смазывание (Flannery et al., *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):840-7). Было показано, что PRG4 существует не только в качестве мономера, но также в качестве димера и мультимера, связанных дисульфидными связями через консервативные богатые цистеином домены как на N-конце, так и на C-конце. Lubris, LLC, разработали полноразмерную рекомбинантную форму лубрицина человека. Молекулу экспрессируют с использованием линии клеток яичника китайского хомячка Selexis (CHO-M) с конечной кажущейся молекулярной массой 450-600 кДа, причем полидисперсные мультимеры часто имеют измеренную массу 1000 кДа или более, во всех случаях при оценке путем сравнения со стандартами молекулярной массы на SDS трис-ацетатных 3-8% полиакриламидных гелях. Среди всего гликозилирования половину составляет две сахарных единицы (GalNAc-Gal) и половину составляют три сахарных единицы (GalNAc-Gal-сиаловая кислота). Этот способ получения рекомбинантного PRG4 человека описан в международной патентной заявке № PCT/US 014/061827.

В различных вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, можно использовать любой один или несколько из различных нативных и рекомбинантных белков и изоформ PRG4. Например, в патентах США №№ 6433142; 6743774; 6960562; 7030223 и 7361738 описано, как получать различные формы продукта экспрессии PRG4 человека, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительным для применения изобретения на практике является полноразмерный гликозилированный рекомбинантный PRG4, или лубрицин, экспрессируемый из клеток CHO. Этот белок содержит 1404 аминокислоты (см. фиг. 6; SEQ ID NO: 1), включая центральный экзон, содержащий повторы последовательности КЕРАРТТ (SEQ ID NO: 3), по-разному гликозилированный O-связанными β (1-3) олигосахаридами Gal-GalNAc и включающий N- и C-концевые последовательности, обладающие гомологией с витронектином. Эта молекула является полидисперсной с варьированием характера гликозилирования отдельных молекул, и она может включать мономерную, димерную и мультимерную формы.

Как используют в рамках изобретения, термин "PRG4" используют взаимозаменяемо с термином "лубрицин". В широком значении эти термины относятся к любым функциональным выделенным или очищенным нативным или рекомбинантным белкам PRG4, их гомологам, функциональным фрагментам, изоформам и/или мутантам. Все пригодные молекулы содержат последовательность, кодируемую экзоном 6, или ее гомологи и укороченные версии, например версии с меньшим количеством повторов в центральном муцин-подобном домене повторов КЕРАПТТ, предпочтительно вместе с О-связанным гликозилированием. Все пригодные молекулы также содержат, по меньшей мере, биологически активные части последовательностей, кодируемых экзонами 1-5 и 7-12, т.е. последовательностей, ответственных за сообщение молекуле ее аффинности к ЕСМ и поверхностям эндотелия. В определенных вариантах осуществления предпочтительный белок PRG4 имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 500 кДа, предпочтительно от 224 до 467 кДа и содержит одну или несколько биологически активных частей белка PRG4, или функциональных фрагментов, таких как смазывающий фрагмент или его гомолог. В более предпочтительном варианте осуществления белок PRG4 включает мономеры со средней молекулярной массой от 220 до приблизительно 280 кДа.

Способы выделения, очистки и рекомбинантной экспрессии белков, таких как белок PRG4, хорошо известны в данной области. В определенных вариантах осуществления способ начинается с клонирования и выделения мРНК и кДНК, кодирующей белки или изоформы PRG4, с использованием стандартных способов молекулярной биологии, таких как ПЦР или ОТ-ПЦР. Затем выделенную кДНК, кодирующую белок или изоформу PRG4, клонируют в экспрессирующий вектор и экспрессируют в клетке-хозяине для получения рекомбинантного белка PRG4 и выделяют из супернатанта клеточной культуры. Способ получения рекомбинантного PRG4 человека описан в международной патентной заявке № PCT/US 014/061827.

Функцию PRG4 до сих пор практически полностью связывали со снижением трения и предупреждения изнашивания сочленений суставов и смазывания тканей поверхности контакта, таких как ткани между поверхностью глаза и глазным веком. Функциональная важность PRG4 для поддержания суставов показана посредством мутаций, которые вызывают синдром камптодактилии-артропатии-кокса вареперикардита (CACP) у человека. CACP проявляется камптодактилией, невоспалительной артропатией и гипертоническим синовитом с деформацией кокса вара, перикардитом и плевральным выпотом. Также у мышей PRG4-ноль наблюдали повреждение хряща и последующую недостаточность суставов. Таким образом, экспрессия PRG4 является необходимым компонентом здоровых синовиальных соединений. Однако, насколько известно заявителям, использование системного пограничного смазывающего вещества, такого как белок PRG4, в качестве противовоспалительного средства, как описано в настоящей заявке, ранее не предлагалось.

PRG4 в качестве противовоспалительного средства.

Открытие противовоспалительных свойств PRG4 основано на изучении различных предполагаемых механизмов, посредством которых PRG4 достигает его противовоспалительного эффекта. Один механизм, посредством которого PRG4 оказывает противовоспалительное действие, вовлекает CD44. Заявители открыли, что PRG4 связывает рецепторы CD44, что позволяет ему действовать в качестве антагониста рецептора CD44. В результате PRG4 способен подавлять провоспалительные ответы, опосредуемые передачей сигнала рецептора CD44.

CD44 представляет собой гликопротеин и значимый рецептор клеточной поверхности с различными изоформами, образующимися в результате альтернативного сплайсинга и гликозилирования, и он играет большую роль в воспалении (Cutly et al., *J Cell Biol* 1992; 116(4):1055-62) и вовлечен в различные межклеточные взаимодействия, метастазирование опухоли и активацию лимфоцитов. CD44 экспрессируется в большом количестве типов клеток млекопитающих, и его уровни экспрессии варьируются между типами клеток и их состоянием активации. Злокачественные или неопластические клетки также могут экспрессировать CD44 и присутствие CD44 на таких клетках указывает на его вовлечение в регуляцию и метастазирование злокачественной опухоли. У человека CD44 кодируется геном CD44 на 1 хромосоме. Передача сигнала через CD44 индуцирует пролиферацию Т-клеток и продукцию IL-2, дозозависимое усиление цитотоксической активности NK и продукцию макрофагами цитокинов и хемокинов, а также другие функции.

Хорошо известным лигандом для CD44 является высокомолекулярный гиалуронан (HMW HA), причем HMW HA связывается с внеклеточным мотивом в CD44, имеющим гомологию с другими HA-связывающими белками, что приводит к последующему внутриклеточному захвату HMW HA (Knudson et al., *Matrix Biol* 2002; 21(1):15-23; Harada et al., *J Biol Chem* 2007; 282(8):5597-607; Tibesku et al., *Ann Rheum Dis* 2006; 65(1):105-8). В экспериментальных моделях остеоартрита экспрессия CD44 в хондроцитах возрастает по мере прогрессирования заболевания, и экспрессия CD44 в суставном хряще может коррелировать с тяжестью заболевания у человека (Fuchs et al., *J Orthop Res* 2004; 22(4) :774-80; Zhang et al., *Mod Rheumatol* 2013; 23(6):1186-91). Взаимодействия HA/CD44 распространены при различных болезненных состояниях. Карциномы, возникающие из эпителии толстого кишечника, имеют тенденцию к развитию в HA-богатой среде, где рецепторы CD44 на эпителиальных опухолевых клетках активируют опосредуемый тирозинкиназой каскад выживания клеток, что приводит к неконтролируемому де-

лению и пролиферации клеток (Misra S. et al. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):219-24). CD44 на эндотелиальных клетках действует, презентуя HA для CD44 на активированных антигеном Т-лимфоцитах, тем самым опосредуя взаимодействия по типу качения, которое обеспечивает привлечение лейкоцитов в воспалительные области (Johnson P. et al. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009 Jul;8(3):208-20), например, в модели ишемии-реперфузии почек быстрая активация CD44 на эндотелиальных клетках капилляров опосредовала привлечение нейтрофилов и нарушала функцию и морфологию почек, в то время как дефицит CD44 снижал приток нейтрофилов независимо от уровня экспрессируемых хемотактических факторов (Rouschop K.M.A. et al. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2034-43).

Роль CD44 может варьироваться в зависимости от типа клеток, воспалительного состояния и может быть специфической для области. Например, было обнаружено, что дефицит CD44 усиливает воспаление в индуцируемой *E. coli*, но не в индуцируемой *S. pneumoniae* пневмонии, что указывает на то, что зависящие от CD44-HA взаимодействия могут ограничивать, а не повышать воспалительный ответ на *E. coli* (Wang Q. et al. *Am J Pathol.* 2002 Dec; 161(6):2219-28).

Другие лиганды CD44 включают компоненты внеклеточного матрикса, например коллагены, фибронектин и ламинин (Naor et al., *Adv Cancer Res* 1997; 71:241-319; Knudson et al., *Cell Mol. Life Sci.* 2002; 59:36-44), матриксную металлопротеиназу-9, комплекс HA-происходящий из сыворотки ассоциированный с гиалуронатом белок (HA-SHAP), гемопексин, EMMPRIN, соматомедин-B, остеопонтин, ОКТЗ или родственные комплементу белки (такие как C33a, CD3, CD46).

Как показывают данные, приведенные в примере 1 ниже, взаимодействие лубрицин-CD44 демонстрирует, что этот гликопротеин имеет функции, выходящие за пределы его пограничного смазывания и механических свойств. В действительности, в примерах 1A-D показано, что лубрицин действует в качестве лиганда, связывающего CD44. Таким образом, поскольку лубрицин связывает CD44, лубрицин можно использовать в качестве антагониста CD44 для предотвращения связывания с CD44 лигандов, таких как гиалуроновая кислота, которые обеспечивают провоспалительную передачу сигнала посредством CD44. Кроме того, вследствие этих продемонстрированных противовоспалительных свойств, лубрицин предлагается в качестве средства для лечения воспалительных состояний, снижающего или ингибирующего воспаление и снижающего или ингибирующего воспалительный ответ.

Другой механизм, посредством которого PRG4 обеспечивает противовоспалительный эффект, открытый заявителями, представляет собой механизм подавления транслокации NF-κB. NF-κB представляет собой белковый комплекс, который контролирует транскрипцию ДНК, является ключевым для выживания клеток и играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа на инфекцию и, в свою очередь, в регуляции продукции цитокинов. NF-κB обычно располагается в цитоплазме практически всех типов клеток животных, и, когда он индуцируется посредством стимула, такого как стрессовое воздействие, цитокины, свободные радикалы, облучение ультрафиолетовым излучением, окисленный LDL и бактериальный или вирусный антигены, мигрирует в ядро. Неправильная регуляция NF-κB ассоциирована со злокачественной опухолью, воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, септическим шоком, вирусной инфекцией и ненадлежащим иммунным развитием. Каскад передачи сигнала NF-κB давно считался прототипным провоспалительным каскадом. Активация передачи сигнала NF-κB запускается серией стадий через один из трех известных путей: канонический, неканонический и атипичный независимый от IκK путь. В неактивированном состоянии NF-κB связан с IκB. Активирующий сигнал (например, связывание TNF-α, IL-1α, LPS, CD40, лимфотоксина, UV, HER2/Neu, H₂O₂ или другой лиганд) вызывает фосфорилирование IκB и запускает его деградацию. Затем свободный несвязанный NF-κB может транслоцироваться в ядро и активировать транскрипцию, например, провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии.

Как показано в примере 1F ниже, введение лубрицина может индуцировать транслокацию NF-κB в модели фибробласт-подобных синовиоцитов ревматоидного артрита. Оказалось, что эффект PRG4 на транслокацию NF-κB опосредуется эффектом PRG4, по меньшей мере, на CD44, как показывают данные в примере 1F. Исходя из этих данных, PRG4 предлагается в качестве противовоспалительного средства и также предлагается в качестве средства для лечения воспалительных состояний, снижения или ингибирования воспаления и снижения или ингибирования воспалительного ответа. PRG4 также предлагается для лечения любого состояния, при котором может быть достигнуто улучшение посредством снижения транслокации NF-κB. Оно включает воспалительные состояния, поскольку NF-κB представляет собой фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию экспрессии многих провоспалительных цитокинов, продуцируемых как врожденной, так и адаптивной иммунной системой.

Также заявители обнаружили, что лубрицин достигает его противовоспалительного эффекта путем ингибирования или подавления продукции ряда провоспалительных цитокинов посредством неизвестных механизмов. Как показывают данные, представленные в примерах 2 и 3 ниже, лубрицин снижает продукцию провоспалительных цитокинов, и, таким образом, имеет противовоспалительный эффект. Этот эффект был продемонстрирован опосредуемым липополисахаридом (LPS) образованием воспалительных цитокинов, опосредуемым TNF-α образованием воспалительных цитокинов и опосредуемым тканевым фактором (TF) образованием воспалительных цитокинов. Таким образом, эффект лубрицина

на продукцию провоспалительных цитокинов был подтвержден рядом различных путей.

Лубрицин также может достигать его противовоспалительного эффекта посредством его функционирования в качестве антиадгезивного/смазывающего вещества. Заявители открыли, что митохондрии в клетках, подвергнутых механическому стрессовому воздействию, могут быть деформированы, что приводит к нарушению их функции и вызывает продукцию активных форм кислорода, клеточную смерть, образование локализованного клеточного дэбриса и последующее локальное воспаление. Смазывающее действие лубрицина, присутствующего на или около таких подвергнутых механическому стрессовому воздействию клетках, ввиду того, что оно смягчает механическое стрессовое воздействие на клетки и их митохондрии, также ингибирует развитие локализованного воспаления.

Вследствие его противовоспалительных свойств лубрицин соответственно является пригодным в качестве общего иммунного модулятора и в качестве противовоспалительного средства, снижающего или ингибирующего воспалительный ответ, посредством, например, снижения или ингибирования образования провоспалительных цитокинов. Следовательно, лубрицин предлагается в качестве средства для лечения воспалительных состояний, снижения или ингибирования воспаления и снижения или ингибирования воспалительного ответа.

Таким образом, посредством этих механизмов действия PRG4 обладает способностью подавлять различные пути передачи сигнала, вовлеченные в воспалительный ответ, и, таким образом, является пригодным в качестве противовоспалительного средства. Как описано в настоящем описании, введение PRG4 предлагается для лечения широкого множества воспалительных состояний и заболеваний и воспаления, ассоциированного с этими состояниями.

Применение PRG4 в качестве противовоспалительного средства.

Вследствие противовоспалительных свойств PRG4, описанных в настоящем описании, PRG4 предлагается для новых применений, ранее недооцененных. В частности, PRG4 предлагается для применения в качестве противовоспалительного средства и предлагается для лечения воспалительных состояний и снижения или ингибирования воспаления.

В одном аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента путем введения пациенту PRG4. В некоторых вариантах осуществления пациент может уже страдать воспалительным состоянием. В других вариантах осуществления он или она может иметь риск развития воспалительного эпизода, например, при наличии рецидивирующего или хронического воспалительного состояния.

В некоторых вариантах осуществления "лечение" пациента может вовлекать предупреждение ухудшения состояния, в то время как в других случаях оно может вовлекать смягчение, или снижение, или ингибирование воспаления, ассоциированного с состоянием. В других вариантах осуществления "лечение" может относиться к снижению уровня одного или нескольких провоспалительных цитокинов у пациента.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента путем введения пациенту PRG4, где PRG4 вводят пациенту в область, которая является не костной, не хрящевой, не офтальмической, не оссальной, не костной и не суставной, или в области, отличные от мочевого пузыря, роговицы или поверхностных тканей полости рта. Таким образом, введение PRG4 локально и прямо в костные или хрящевые ткани, на переднюю поверхность глаза, в суставные сочленения, в мочевой пузырь или в полость рта выходит за пределы объема изобретения, заявленного в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента, где способ вовлекает введение пациенту PRG4, который связывает рецептор CD44 на клетке пациента, снижает или ингибирует продукцию провоспалительного цитокина у пациента или снижает или ингибирует транслокацию NF- κ B в клетке пациента. В результате у пациента происходит снижение или ингибирование воспалительного ответа.

В то время как пациентом предпочтительно является человек, пациентом может быть любое млекопитающее, например лошадь, корова, свинья, крыса, мышь, собака или кошка.

Хотя лубрицин продуцируется естественным образом в организме, эффекты изобретения наблюдаются, когда пациенту вводят экзогенный лубрицин. Таким образом, в одном варианте осуществления PRG4, вводимый пациенту, представляет собой экзогенный лубрицин человека, в то время как в другом варианте осуществления PRG4, вводимый пациенту, представляет собой рекомбинантный лубрицин человека (rhPRG4). В другом варианте осуществления rhPRG4 имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления PRG4 вводят в количестве, которое является недостаточным для обеспечения пограничного смазывания. Таким образом, терапевтически эффективное количество лубрицина для введения согласно изобретению находится в диапазоне от 0,1 до 4000 мкг/кг, или от 0,1 до 1000 мкг/кг, или от 0,1 до 100 мкг/кг, или от 0,1 до 50 мкг/кг. В другом варианте осуществления лубрицин вводят, например, путем нанесения на поверхность ткани в количестве от 0,1 мкг/мл до 30 мг/мл, или от 1 мкг/мл до 10 мг/мл или от 10 мкг/мл до 1 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления лубрицин вводят в небольших объемах 1-100 мкл на дозу. В некоторых вариантах осуществления лубрицин вводят в больших объемах от 100 мкл до 4 л, например, в качестве клизмы. В следующих вариантах осуществле-

ния лубрицин вводят в концентрациях не более 60 мкг/мл.

Количество вводимого лубрицина зависит от таких переменных, как уровень и область воспаления, степень тяжести состояния, подлежащего лечению, общее состояние здоровья пациента, фармацевтический состав и путь введения. Первоначальную дозировку можно увеличивать выше верхнего уровня для быстрого достижения желаемого уровня в крови или уровня в ткани. Альтернативно первоначальная дозировка может быть меньше оптимальной, и дозировку можно постепенно увеличивать в ходе лечения. Оптимальную дозу можно определять посредством стандартного экспериментирования.

Для введения лубрицин предпочтительно комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем. Как используют в рамках изобретения, "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и эксципиенты, пригодные для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск. Носитель(и) должен быть "приемлемым" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами составов и не вредоносным для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, обеспечивающие изотоничность и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются совместимыми с фармацевтическим введением. Носители также могут включать такие биоматериалы, как матрицы, гидрогели, полимеры, тканевые каркасы и резорбируемые материалы носителей, включающие коллагеновые губки. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Пригодные составы можно получать способами, хорошо известными в области фармацевтики (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)). Компоненты состава, пригодные для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как EDTA; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Лубрицин для введения может быть предоставлен в единичной дозированной форме и может быть получен любым подходящим способом, и он должен быть составлен так, чтобы он был совместимым с предполагаемым путем введения.

В рамках изобретения предусматривается, что PRG4 можно вводить пациенту системно или локально. Локальное введение может быть оправданным в случаях, когда воспалительный ответ является локализованным в конкретной ткани или органе, и доступ к ткани или органу является возможным, например посредством инъекции или локального введения. Однако также в некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается системное введение. Системное введение может быть оправданным, когда воспалительный ответ является локализованным, но локальный ответ неосуществим или иным образом не показан. Системное введение также может быть оправданным, когда воспалительный ответ не является локализованным в одной области пациента, а обнаруживается повсеместно у пациента или находится более чем в одной области у пациента. Кроме того, поскольку провоспалительные клетки мигрируют через кровеносную систему пациента, системное введение может быть оптимальным способом введения, чтобы гарантировать, что PRG4 имеет наибольшую возможность взаимодействовать и противодействовать активности провоспалительных клеток, например, при лечении сепсиса.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения лубрицин вводят системно для достижения снижения или ингибирования воспалительного ответа или для лечения воспалительного состояния. Например, лубрицин можно вводить системно энтеральным путем, таким как пероральная, ректальная, сублингвальная, сублабиальная или буккальная доставка. В другом варианте осуществления лубрицин можно вводить системно парентеральным путем, таким как назальная, ингаляционная, внутривенная, внутримышечная, подкожная, внутривоковая, внутрибрюшинная или чресслизистая доставка.

В другом варианте осуществления лубрицин вводят локально для достижения снижения или ингибирования воспалительного ответа или для лечения воспалительного состояния. Например, лубрицин можно вводить локально местным путем или посредством локальной инъекции в ткань или орган организма, и он может обеспечивать покрытие из лубрицина на, в или вокруг конкретной ткани или органа организма. Согласно одному варианту осуществления изобретения, когда PRG4 вводят локально, его вводят в область и в, вокруг, на или вблизи ткани, которая является не хрящевой, не костной, не оссальной и не суставной и не является рогамицей, полостью рта или мочевым пузырем. Например, в одном варианте осуществления PRG4 не вводят локально в роговицу или окружающие ткани или в хрящевые, костные или суставные сочленения или ткани. В другом варианте осуществления PRG4 не вводят локально в мочевой пузырь или полость рта. Однако в другом варианте осуществления PRG4 вводят локально, например, местным путем, или посредством инъекции, в задние области глаза, на кожу, в почку, легкие, печень, рану или хирургический разрез, щитовидную железу, поджелудочную железу, селезенку, тимус, яичник, семенник, матку, надпочечник, гипофиз, гипоталамус, мочеиспускательный канал, предстательную железу, сердце, артерию или сосуд, головной мозг или желудок. Также введение проводят в отверстия, включающие прямую кишку, нос, ухо, глотку, гортань, трахею. Другие области введения включают язык, заднюю область глаза или область опухоли. Введение также проводят во внутренние

органы, включая тонкий кишечник, толстый кишечник, ободочную кишку или пищевод. В некоторых вариантах осуществления область введения может представлять собой область воспаления, в то время как в других вариантах осуществления область введения может быть выбрана для простоты введения.

В следующем варианте осуществления лубрицин вводят локально в щитовидную железу для лечения воспаления, ассоциированного с подагрой, посредством инъекции в или около щитовидной железы. В другом варианте осуществления лубрицин вводят локально в область травмы или повреждения ткани, такую как рана или хирургический разрез, путем инъекции или местного нанесения на область. В другом варианте осуществления лубрицин вводят локально на кожу посредством местного введения.

Для применения изобретения на практике PRG4 можно составлять в носителе, например, суспендировать в фосфатно-солевом буфере, в концентрациях в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл и более предпочтительно 100-500 мкг/мл. Подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Stomphor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS), необязательно в смеси с поверхностно-активными веществами, такими как полисорбаты. Носитель должен быть стабильным в условиях производства и хранения, и он должен быть защищен от микроорганизмов. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащий, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Время введения зависит от различных факторов и состояния, подвергаемого лечению. Например, в одном варианте осуществления введение лубрицина для лечения воспаления, которое свойственно хроническому состоянию, может осуществляться раз в сутки, раз в неделю, раз в две недели, два раза в сутки или раз в месяц. В другом варианте осуществления лечение воспаления, которое свойственно острому состоянию, может требовать введения лубрицина непрерывно, например, посредством внутривенного вливания в течение фиксированного периода времени.

В одном варианте осуществления воспалительный ответ представляет собой острый воспалительный ответ. Таким образом, в одном варианте осуществления воспалительное состояние, которое лечат согласно изобретению, или воспалительное состояние, которым страдает пациент, связано с или вызвано инфекцией, например вирусной, бактериальной, грибковой, паразитарной инфекцией, или воздействием микробных токсинов, свойственных инфекции; некрозом, например, вызванным ишемией, травмой, физическим или химическим повреждением, термическим повреждением или излучением; инородными телами, такими как осколки, грязь, чужеродная ткань или швы или другой медицинский имплантат; или иммунной реакцией, такой как вследствие гиперчувствительности, такой как аллергия, ведущая, например, к анафилактическому воспалению. В другом варианте осуществления воспалительное состояние, которое лечат согласно изобретению, или воспалительное состояние, которым страдает пациент, связано с или вызвано хроническим воспалительным ответом, таким как воспалительный ответ на персистирующее повреждение или инфекцию, такие как туберкулез или язва; длительное воздействие токсина; аллергией или аутоиммунным состоянием. Некоторые хронические воспалительные состояния включают диабет, злокачественную опухоль, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера, заболевания легких (например, туберкулез), артрит (например, подагра, остеоартрит), аутоиммунные заболевания (например, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, волчанка, глютенная болезнь и т.д.) и неврологические заболевания.

Воспалительные состояния, которые можно лечить способами по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, угревую сыпь; острую недостаточность органов; острый респираторный дистресс-синдром (ARDS); болезнь Аддисона; аллергический ринит; отторжение аллотрансплантата; очаговую алопецию; болезнь Альцгеймера; анафилаксию; аппендицит; артрит; астму; атеросклероз; атопический дерматит; аутоиммунную алопецию; аутоиммунное заболевание; аутоиммунный гипертиреозидизм; аутоиммунный гипопитуитаризм; аутоиммунное плюригландулярное заболевание; болезнь Бехчета; повреждение головного мозга; бронхит; злокачественную опухоль; реперфузионный синдром; кардиоренальный синдром; глютенную болезнь; хронической актинической дерматит; хроническое обструктивное заболевание легких (COPD); хроническую почечную недостаточность; колит; контактный дерматит; болезнь Крона; дерматомиозит; диабет; экзему; эмфизему; отторжение инородного тела; глаукому; гломерулонефрит; подагру; реакцию "трансплантат против хозяина"; болезнь Грэйвса; синдром Гийена-Барре; тиреоидит Хашимото; сенную лихорадку; гепаторенальный синдром; гиперчувствительность или аллергию; миозит с тельцами включения; инфекцию вследствие вирусной, грибковой, паразитарной или микробной инфильтрации; воспалительное заболевание кишечника; воспалительное заболевание почек; повреждение после термического или химического воздействия или облучения; синдром раздраженной кишки; ишемию; воспаление легких; дегенерацию желтого пятна, кольцевидную склеродермию; рассеянный склероз; фунгоидный микоз; инфаркт миокарда; некроз; неинфекционное повреждение легких; остеоартрит; панкреатит; пернициозную анемию; пневмонию; полимиозит; простатит; псевдоподагру; псориаз; псориазический артрит, ладонно-подошвенный пустулез; гангренозную пиодермию; респираторную аллергию; воспаление сетчатки; ретинит; ревматоидный артрит; склеродермию; сепсис; сыпороточную болезнь; синдром Сезари; синдром Шегрена; кожную аллергию; инсульт; синдром системного воспалительного ответа (SIRS); системную красную волчанку; системную склеродермию; заболевание, обусловленные гиперчувствительностью, опосредуемой T-клетками; отторжение трансплантата; травму,

в том числе вследствие пулевого ранения, ножевого ранения, автомобильной катастрофы, падения или драки; туберкулез; язвенный колит; крапивницу, увеит; перикардит или витилиго.

В некоторых вариантах осуществления воспалительные состояния суставов или костей и воспалительные состояния глаза можно лечить посредством системного введения PRG4 и снижения или ингибирования воспалительных ответов в тканях глаза, суставов, хряща и кости. Такие воспалительные состояния включают, но не ограничиваются ими, дегенерацию желтого пятна, увеит, ретинит и артрит, включая остеоартрит, псориатический артрит, ювенильный идиопатический артрит и ревматоидный артрит.

В некоторых вариантах осуществления, когда PRG4 связывает рецептор CD44 на клетке, клетка может представлять собой белую клетку крови (т.е. лейкоцит), такую как лимфоцит (например, Т-клетка, В-клетка, НК-клетка), нейтрофил, эозинофил, базофил и моноцит, макрофаг или дендритная клетка; клетку надпочечника; клетку головного мозга; злокачественную клетку; клетку сердца; хондроцит; клетку толстого кишечника; клетку конъюнктивы; клетку роговицы; дендритную клетку; эндотелиальную клетку; эпителиальную клетку; фибробласт; клетку желчного пузыря; клетку желудка; клетку печени; иммунную клетку, такую как тучная клетка, дендритная клетка, лимфоцит, лейкоцит или макрофаг; клетку кишечника; лейкоциты; лимбальную клетку; клетку легкого; лимфоцит; макрофаг; тучную клетку; мышечную клетку; нервную клетку; клетку глаза или офтальмическую клетку; остеобласт; остеокласт; клетку поджелудочной железы; клетку прямой кишки; клетку почки; клетку сетчатки; клетку селезенки; стволовую клетку; синовиоцит; клетку тимуса; клетку щитовидной железы; клетку трабекулярной сети; уретральную клетку или клетку сосуда. Однако этот перечень не является ограничивающим.

В некоторых вариантах осуществления, когда введение PRG4 снижает или ингибирует транслокацию NF-κB в клетке, клетка может представлять собой белую клетку крови (т.е. лейкоцит), такую как лимфоцит (например, Т-клетка, В-клетка, НК-клетка), нейтрофил, эозинофил, базофил и моноцит, макрофаг или дендритная клетка; клетку надпочечника; клетку головного мозга; злокачественную клетку; клетку сердца; хондроцит; клетку толстого кишечника; клетку конъюнктивы; клетку роговицы; дендритную клетку; эндотелиальную клетку; эпителиальную клетку; фибробласт; клетку желчного пузыря; клетку желудка; клетку печени; иммунную клетку, такую как тучная клетка, дендритная клетка, лимфоцит, лейкоцит или макрофаг; клетку кишечника; лейкоциты; лимбальную клетку; клетку легкого; лимфоцит; макрофаг; тучную клетку; мышечную клетку; нервную клетку; клетку глаза или офтальмическую клетку; остеобласт; остеокласт; клетку поджелудочной железы; клетку прямой кишки; клетку почки; клетку сетчатки; клетку селезенки; стволовую клетку; синовиоцит; клетку тимуса; клетку щитовидной железы; клетку трабекулярной сети; уретральную клетку или клетку сосуда. Однако этот перечень не является ограничивающим.

В некоторых вариантах осуществления, когда PRG4 связывает рецептор CD44 на клетке или когда введение PRG4 снижает или ингибирует транслокацию NF-κB в клетке, и когда клетка представляет собой синовиоцит, хондроцит, остеокласт, остеобласт, клетку сетчатки, лимбальную клетку, клетку трабекулярной сети, клетку роговицы, клетку конъюнктивы, клетку глаза или офтальмическую клетку, PRG4 вводят пациенту системно.

В следующем варианте осуществления провоспалительный цитокин, продукция которого ингибируется или снижается посредством введения лубрицина, представляет собой IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17α, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF-α, TNF-β (лимфотоксин-α), лимфотоксин-β, CXCL1 (фракталикин), CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω, IFN-γ, VEGF, MCP-1, MCP-3, EGF, GM-CSF, CD40L, CD27L, CD30L, FASL, 4-1BBL, OX40L, TRAIL, FGF-2, GRO, MDC, Rantes, G-CSF, M-CSF, FGF-2, EPO, MCSF, MIP3α, MG-CSF или GCSF. В следующем варианте осуществления введение лубрицина снижает или ингибирует уровень одного или нескольких, двух или нескольких, или трех или нескольких, или четырех или нескольких из вышеупомянутых провоспалительных цитокинов.

В одном варианте осуществления снижение или ингибирование продукции провоспалительного цитокина может быть подтверждено более низким уровнем цитокина в образце жидкости организма, полученном от пациента после введения лубрицина, по сравнению с уровнем до его введения. Образец жидкости организма может представлять собой, например, кровь или плазму. Учитывая, что эффект лубрицина на уровень данного цитокина может не поддаваться измерению непосредственно при введении лубрицина, снижение или ингибирование можно наблюдать в ходе часов, суток или недель после первоначального введения лубрицина.

В другом аспекте изобретение относится к способу ингибирования связывания лиганда с CD44, присутствующим на поверхности. Согласно этому способу поверхность подвергают воздействию лубрицина, и лубрицин связывается с CD44 и ингибирует связывание лиганда.

В одном варианте осуществления поверхность может представлять собой поверхность клетки, экспрессирующей CD44, такой как клетка млекопитающего. В другом варианте осуществления поверхность находится в детекторе поверхностного плазмонного резонанса. В другом варианте осуществления поверхность клетки находится в человеке.

Согласно одному варианту осуществления клетка, экспрессирующая CD44, включает белые клетки крови (т.е. лейкоциты), такие как лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки), нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты, макрофаги и дендритные клетки; эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, синовиоциты, хондроциты, остеокласты, остеобласты, клетки сердца, тучные клетки, мышечные клетки, клетки легкого, клетки почки, клетки печени, клетки головного мозга, клетки селезенки, клетки мочеиспускательного канала, клетки сосуда, нервные клетки, клетки поджелудочной железы, клетки желудка, клетки тонкого кишечника, клетки толстого кишечника, клетки прямой кишки, клетки глаза или офтальмические клетки, клетки желчного пузыря и створчатые клетки.

В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая CD44, представляет собой неопластическую или злокачественную клетку. В одном варианте осуществления злокачественная клетка включает клетки рака молочной железы, клетки рака толстого кишечника, клетки рака эндометрия, клетки рака яичника, клетки рака кожи, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака печени, клетки рака почки, клетки рака шейки матки, клетки рака легкого, клетки рака языка, клетки рака поджелудочной железы, клетки немелкоклеточной карциномы легких, клетки рака головы и шеи, клетки рака предстательной железы, клетки рака тела матки, клетки печеночно-клеточной карциномы, клетки рака желудка, клетки карциномы носоглотки, клетки рака желчного пузыря, клетки рака анального канала, клетки остеосаркомы, клетки липосаркомы, клетки лейомиосаркомы, клетки рабдомиосаркомы, клетки нейрофибросаркомы, клетки желудочно-кишечной стромальной опухоли, клетки опухоли кровеносных сосудов, клетки фибросаркомы, клетки лимфомы и клетки злокачественной опухоли головного мозга.

В одном варианте осуществления способа лиганд, ингибируемый связыванием PRG4 с CD44, находящимся на поверхности, может представлять собой гиалуронан (HA), комплекс гиалуронан-происходящий из сыворотки ассоциированный с гиалуронаном белок (HA-SHAP), матриксную металлопротеиназу 9, цитокин, хемокин, интерферон, интерлейкин, лимфокин, фактор некроза опухоли, фактор роста или гормон.

В одном варианте осуществления этого способа лубрицины предоставляют в количестве, которое является недостаточным для обеспечения пограничного смазывания. Заявители определили, что эффект лубрицина на связывание CD44 может быть достигнут при концентрациях, значительно более низких, чем концентрации, необходимые для достижения пограничного смазывания. Таким образом, в одном варианте осуществления лубрицины вводят в количестве в диапазоне от 0,1 до 4000 мкг/кг. В одном варианте осуществления лубрицины вводят системно, т.е. посредством внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекции, хотя его можно вводить локально.

В одном варианте осуществления клетка, экспрессирующая CD44, представляет собой клетку млекопитающего, и в другом варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека. Настоящее изобретение можно применять в ряде контекстов для лечения заболевания и патологических состояний, в которые вовлечено связывание и/или активация CD44 лигандом.

Данные указывают на то, что передача сигнала CD44 вовлечена в прогрессирование злокачественной опухоли, и она также может препятствовать эффективности определенных химиотерапевтических средств. Например, было показано, что резистентность множественной миеломы к лечению химиотерапевтическим средством дексаметазоном может быть вызвана связыванием CD44 с HA (Ohwada et al., Eur J Hematol 2008; 80:245). Таким образом, в одном варианте осуществления лубрицины можно использовать для связывания с CD44 на поверхности злокачественной клетки для ингибирования передачи сигнала CD44, вовлеченной в рост злокачественных клеток, выживаемость, прогрессирование или активность метастазирования. В другом варианте осуществления лубрицины вводят пациенту, имеющему злокачественную опухоль, или пациенту, имеющему риск развития злокачественной опухоли, для лечения злокачественной опухоли или замедления роста или прогрессирования опухоли. Согласно другому варианту осуществления лубрицины можно вводить одновременно с химиотерапевтическим или радиологическим лечением злокачественной опухоли. Таким образом, в одном варианте осуществления лубрицины вводят пациенту, имеющему злокачественную опухоль, где лубрицины вводят для лечения злокачественной опухоли или где лубрицины вводят совместно с другим лекарственным средством против злокачественной опухоли или способом лечения злокачественной опухоли для лечения злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль находится у человека.

В другом варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой рак надпочечника, рак анального канала, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга/ЦНС, базально-клеточный рак кожи, рак молочной железы, болезнь Кастанеллы, рак шейки матки, рак ободочной и прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, возвышающуюся дерматофибросаркому, семейство опухолей Юинга, злокачественную опухоль глаза, рак желчного пузыря, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), рак желудка, гестационное трофобластное заболевание, глиому, глиобластому, рак головы и шеи, болезнь Ходжкина, саркому Капоши, рак почки, рак гортани и гипофарингеальный рак, лейкоз, рак легкого, рак печени, лимфому, злокачественную мезотелиому, карциному клеток Меркеля, меланому, множественную миелому, миелому, миелодиспластический синдром, рак носовой полости и околоносовой пазухи, рак носоглотки, нейроэндокринный рак, нейробластому, неходжкинскую лимфому, рак полости рта и ротоглотки, остеосаркому, рак яични-

ка, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак предстательной железы, рак почки, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, плоскоклеточный рак кожи, рак тонкого кишечника, рак желудка, рак яичка, рак тимуса, рак щитовидной железы, рак тела матки, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема или опухоль Вильмса.

CD44 также вовлечен в прогрессирование диабета, и данные указывают на то, что блокирование CD44 может обеспечить антидиабетический эффект. HA обнаруживается в островковых клетках поджелудочной железы и связывание HA с CD44 на островковых клетках приводит к воспалению и разрушению островковых клеток, что приводит к инсулинзависимому диабету. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу предупреждения или лечения диабета путем введения лубрицина пациенту, имеющему диабет или имеющему риск развития диабета. В другом варианте осуществления лубрицин приводит в контакт с клетками поджелудочной железы в концентрации, достаточной для связывания CD44, тем самым ингибируя или снижая взаимодействие между CD44 и HA в поджелудочной железе.

В другом варианте осуществления PRG4 можно использовать для лечения воспалительного заболевания кишечника, такого как болезнь Крона или колит. В таких случаях концентрированный раствор PRG4 можно вводить в желудочно-кишечный тракт посредством простого проглатывания, клизмы, питательной трубки, G-трубки, J-трубки или колостомии. В случае проглатывания PRG4 может быть инкапсулирован в таблетку, оболочку или капсулу, предпочтительно биodeградируемую, где таблетка, оболочка или капсула изготовлена из вещества, которое деградирует или иным образом диссоциирует под воздействием условий, присутствующих в желудочно-кишечном тракте пациента. Такие пероральные составы могут присутствовать в полимере в качестве системы доставки с замедленным высвобождением. Пероральные составы хорошо известны в технологии доставки лекарственных средств, и специалист способен выбрать такую таблетку, оболочку или капсулу соответствующим образом для доставки PRG-4 посредством проглатывания.

В другом варианте осуществления PRG4 можно использовать для лечения повреждения головного мозга, вызванного инсультом, эмболией или травмой. Для лечения повреждения головного мозга концентрированный раствор PRG4 можно инъектировать в/в после инсульта, эмболии или травмы, в течение ограниченного периода времени после повреждения головного мозга. Альтернативно PRG4 можно помещать в ходе хирургической операции на головном мозге в область головного мозга. Это введение такой композиции в головной мозг предназначено для стабилизации кровеносных сосудов, ограничения сосудистой проницаемости и также сообщает противовоспалительный эффект.

В другом варианте осуществления PRG4 можно использовать для снижения симптомов, ассоциированных с аллергией и/или респираторными инфекциями. Такие симптомы включают запор, стекание слизи из носоглотки, кашель, чихание, ринорею, зуд в глотке, кожный зуд и зудящие слезящиеся глаза, среди многих других. В одном варианте осуществления изобретения предусматривается способ лечения пациента, демонстрирующего такие симптомы или имеющего риск развития таких симптомов, включающий стадию введения на поверхность организма пациента, страдающего или имеющего риск развития симптомов аллергии, например кожу или дыхательные пути, например верхние дыхательные пути, количества PRG4-содержащей композиции, достаточного для смягчения симптомов. Способ согласно этому варианту осуществления может включать депонирование интраназально на поверхность слизистой оболочки носа и пазух пациента назальной композиции, содержащей PRG4 в количестве, достаточном для смягчения по меньшей мере одного симптома аллергии и/или инфекции верхних дыхательных путей. В одном варианте осуществления PRG4-содержащую назальную композицию вводят в качестве назального спрея.

Аллергия представляет собой тип воспаления, адаптивную иммунную реакцию, которая включает такие заболевания, как аллергическая астма, атопический дерматит, аллергический ринит и несколько аллергических заболеваний глаз. Она характеризуется опосредуемым Th2 гуморальным ответом на антигенную нагрузку. В типичной аллергической реакции гиперчувствительности типа I первоначальное воздействие аллергена вызывает продукцию В-клетками IgE-антител, которые связываются с поверхностью тучных клеток/базофилов, сенсибилизируя эти клетки к аллергену. Последующее воздействие того же антигена приводит к немедленной дегрануляции тучных клеток и последующему высвобождению гистамина, простагландинов, лейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄), хемокинов (CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4, CCL5), протеаз (триптаза, химаза) и цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и IL-13 (Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science 2001; Larché et al., *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10):761-71). Эти эффекторные молекулы вызывают расширение мелких кровеносных сосудов, повышенную сосудистую проницаемость, массовую продукцию слизи и локальное сокращение гладких мышц, что приводит к известным симптомам, ассоциированным с аллергическими реакциями. Через несколько часов поздняя фаза аллергической реакции включает привлечение эозинофилов, базофилов и Th2-лимфоцитов в область реакции. Эозинофилы высвобождают серию гранульных белков, таких как катионный белок эозинофилов, главный основной белок, пероксидаза эозинофилов и происходящий из эозинофилов нейротоксин, а также серию активных форм кислорода (пероксидов), которые действуют, очищая область посредством окислительного стресса и рибонуклеазной активности.

Являясь токсичными для вторгшихся организмов, эозинофильные ответы также разрушают клетки хозяина вблизи области аллергической реакции.

После установления петли положительной обратной связи между повреждением ткани и привлечением воспалительных клеток, хроническое воспалительное состояние может сохраняться даже без длительного воздействия исходного аллергена (Murdoch J.R., Lloyd C.M. *Chronic Inflammation and Asthma. Mutat Res.* 2010; Aug 7; 690(1-2):24-39. doi: 10.1016/j.mrfmmm. 2009, 09, 005. Epub 2009 Sep 19). В частности, хроническое воспаление сопровождается ремоделированием тканей, которое приводит к нарушению функции эпителиального барьера, экспрессии матриксной металлопротеиназы и гиперплазии слизистых желез, а также к опосредуемому TGF- β фиброзу (Murdoch et al.). Например, при хронической астме многократные циклы опосредуемого эозинофилами повреждения и последующего синтеза матрикса фибробластами приводит к утолщенным, суженным, менее эластичным дыхательным путям, причем ремоделирование дыхательных путей связано непосредственно с хроническим характером нарушения (Murdoch et al.). Следует отметить, что преобладающие способы терапии астмы, нацеленные на снижение воспаления (кортикостероиды), демонстрируют ограниченную эффективность в отношении смягчения ремоделирования (Murdoch et al.; Ward C., Walters H., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006; Feb;5(1):43-8). Также может быть обнаружено, что такое аномальное ремоделирование тканей и опосредуемый TGF- β фиброз ассоциированы с повторяющимися хирургическими операциями в некоторой области у пациента.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения нанесение содержащих PRG4 композиций на ткани, подвергающиеся длительному аллергическому ответу, является полезным вследствие повышенного выведения аллергена, а также сниженного воспаления при ингаляции аэрозольного PRG4. Способность таких композиций к пограничному смазыванию также будет препятствовать адгезии частиц слизи к эпителию, а также к улучшенной гидратации, поскольку высокозаряженная молекула PRG4 является гигроскопической и удерживает воду вдоль поверхности эпителия. Вследствие улучшенного смазывания поверхности ткани после нанесения PRG4-содержащих композиций механическое выведение аллергенов потребует меньшего усилия, поскольку трение между частицами (включающими совокупность муцина, дебриса и аллергенов) и эпителием снижается. При более низком трении механическое выведение через, например, дыхательные пути и мукоцилиарный клиренс (дыхательная система) потребует меньшего усилия и приведет к меньшему повреждению ткани и воспалению. Введение PRG4-содержащих композиций пациентам, страдающим хронической аллергией, также приведет к смягчению фиброза посредством препятствования адгезии и миграции фибробластов, которое снизит общий фиброзный ответ.

Без связи с теорией этот аспект настоящего изобретения основан частично на признании того, что последствия, ассоциированные с нарушением регуляции иммунной системы или длительным воздействием аллергенов, могут быть результатом ухудшенного механического выведения антигенов, PAMP и DAMP, а также нарушенной функции тканей, ассоциированной с повторяющимся ремоделированием. Лубрицин может способствовать механическому выведению аллергенов или клеточного дебриса. Эти процессы не только усиливают воспаление, но также приводят к длительному повреждению тканей - респираторных, глазных или кожных, и полагают, что состояния с положительной обратной связью являются сходными.

Следующие данные указывают на то, что взаимодействие CD44-НА может приводить к увеличению селезенки, что является состоянием, часто ассоциированным с диабетом. Таким образом, один аспект изобретения относится к способу приведения в контакт селезенки с лубрицином для предупреждения воспаления и увеличения селезенки. В другом варианте осуществления лубрицин приводят в контакт с клетками селезенки в концентрации, достаточной для связывания CD44, тем самым снижая увеличение и воспаление селезенки.

CD44 также присутствует в синовиальных тканях и активируется у пациентов с ревматоидным артритом. Было показано, что экспрессирующие CD44 синовиоциты связываются с НА-SHAP в синовиальной жидкости, полученной от пациентов-людей с ревматоидным артритом. Количество образовавшегося комплекса положительно коррелирует со степенью воспаления. Это демонстрируется данными, показанными в примере 4. Таким образом, системное введение лубрицина предлагается в качестве способа лечения для снижения воспаления у пациентов, страдающих ревматоидным артритом. В одном варианте осуществления лубрицин вводят системно пациенту, имеющему ревматоидный артрит, для блокирования эффекта активации CD44 и снижения воспаления. В одном варианте осуществления лубрицин периодически вводят внутривенным путем. В другом варианте осуществления лубрицин доставляют с помощью внешнего переносного насоса через постоянный подкожный катетер.

Взаимодействия CD44-НА также могут играть ключевую роль в транспорте вредоносных лейкоцитов через барьер кровь-сетчатка и в иммунопатологиях переднего сегмента (Xu H., et al. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72(6):1133-41), а также в глаукоме, где обнаружена значительная корреляция между уровнями растворимого CD44 и тяжестью потери полей зрения (Mokbel T.H. et al., *Clin Experiment Ophthalmol.* 2010 Aug;38(6):560-5). В одном аспекте rhPRG4 вводят в глаз для антагонизма CD44 и прерывания взаимодействий с НА. В одном варианте осуществления инъекционный rhPRG4 снижает воспали-

ние и обеспечивает улучшенный кровоток и выживаемость клеток сетчатки. В другом варианте осуществления ghPRG4, инъецированный в глаз, препятствует опосредуемой CD44 закупорке трабекулярной сети при первичной открытоугольной глаукоме, что приводит к снижению внутриглазного давления. В другом варианте осуществления ghPRG4 инактивирует растворимый CD44 во внутриглазной жидкости, препятствуя цитотоксичности растворимого CD44. В другом варианте осуществления ghPRG4 является антагонистом трансмембранного CD44, прерывает расщепление металлопротеиназой внеклеточного домена и препятствует повышению уровня растворимого CD44. В другом варианте осуществления лубрицин, инъецированный в глаз, снижает последствия для зрения, такие как плавающие помутнения, размытое зрение и фотопсия, ассоциированные с задним увеитом. В другом варианте осуществления лубрицин, инъецированный в глаз, прерывает опосредуемый CD44 и RHAMM ангиогенез и миграцию эндотелиальных клеток путем препятствования взаимодействию низкомолекулярных продуктов деградации HA. Другие варианты осуществления включают инъекцию или местное применение лубрицина в глаз для предотвращения опосредуемого CD44 прогрессирования дегенерации желтого пятна, ретинита, ретинального васкулита, хориоретинита, неоваскуляризации и диабетической ретинопатии. Например, учитывая локализованную глазную среду, лубрицин вводят в количестве от 0,1 мкг/мл до 30 мг/мл небольшими объемами (1-100 мкл) на дозу.

В другом варианте осуществления изобретения ghPRG4 можно использовать для лечения опосредуемых не CD44 глазных нарушений с использованием способов и композиций, как описано выше. В таких случаях инъекцию и местное нанесение лубрицина в глаз можно использовать для предупреждения опосредуемого не CD44 прогрессирования дегенерации желтого пятна, ретинита, ретинального васкулита, хориоретинита, неоваскуляризации и диабетической ретинопатии.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения или ингибирования уровня провоспалительных цитокинов в организме, причем способ включает системное, ингаляционное или местное введение PRG4 в количестве, достаточном для ингибирования или снижения уровней провоспалительных цитокинов. В одном варианте осуществления способ снижает или ингибирует уровень одного провоспалительного цитокина, в то время как в другом способ снижает или ингибирует уровень более чем одного провоспалительного цитокина. Иллюстративные воспалительные состояния, повреждения и аутоиммунные состояния, вызывающие воспалительный ответ, который приводит к увеличенным уровням провоспалительных цитокинов в крови и которым может страдать пациент, которого лечат в соответствии с изобретением, описаны на протяжении настоящей заявки.

Согласно одному варианту осуществления цитокины, продукция которых может ингибироваться или снижаться посредством введения лубрицина, включают IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17 α , IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF- α , TNF- β (лимфотоксин- α), лимфотоксин- β , CXCL3 (фракталкин), CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- γ , VEGF, MCP-1, MCP-3, EGF, GM-CSF, CD40L, CD27L, CD30L, FASL, 4-1BBL, OX40L, TRAIL, FGF-2, GRO, MDC, Rantes, G-CSF, M-CSF, FGF-2, EPO, MCSF, MIP3 α , MG-CSF или GCSF.

В одном варианте осуществления кровь представляет собой кровь человека. В следующем варианте осуществления кровь представляет собой кровь пациента-человека, имеющего воспалительный ответ или состояние. В одном варианте осуществления воспалительный ответ или состояние являются результатом повреждения ткани, в то время как в другом воспалительный ответ является результатом аутоиммунного состояния, а в следующем варианте осуществления воспалительный ответ является результатом бактериальной или вирусной инфекции или присутствия токсина. В другом варианте осуществления пациент страдает или имеет риск сепсиса.

В следующем варианте осуществления клетка человека представляет собой иммунную клетку, такую как тучная клетка, дендритная клетка, лимфоцит, лейкоцит или макрофаг; эпителиальную клетку; эндотелиальную клетку; фибробласт; синовиоцит; хондроцит; остеокласт; остеобласт; клетку сердца; тучную клетку; клетку легкого; клетку почки; клетку печени; клетку головного мозга; клетку селезенки; клетку мочевого пузыря или уретральную клетку; клетку сосуда; нервную клетку; клетку поджелудочной железы; клетку желудка; клетку кишечника; клетку толстого кишечника; клетку прямой кишки; клетку сетчатки; лимбальную клетку; клетку трабекулярной сети; клетку роговицы; клетку конъюнктивы; клетку глаза или офтальмическую клетку; клетку желчного пузыря или злокачественную клетку.

В одном варианте осуществления лубрицин вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания, т.е. его вводят в диапазоне от 0,1 до 4000 мкг/кг. В другом варианте осуществления лубрицин вводят в количестве от 0,1 мкг/мл до 30 мг/мл и его вводят небольшими объемами от 1 до 100 мкл на дозу. В другом варианте осуществления лубрицин вводят в объемах от 100 мкл до 4 л на дозу. В одном варианте осуществления лубрицин предоставляют пациенту-человеку посредством системного введения.

В конкретном варианте осуществления клетка находится в пациенте, страдающем или имеющем риск развития сепсиса, например, вызванного воздействием вирусных или бактериальных токсинов, та-

ких как LPS, флагеллин и т.п. Таким образом, в одном аспекте лубрицин предлагается для лечения сепсиса.

В следующем аспекте изобретение относится к способу ингибирования транслокации NF-κB в клетке посредством приведения в контакт клетки с PRG4, где PRG4 ингибирует активацию каскада передачи сигнала NF-κB. В одном варианте осуществления PRG4 ингибирует транслокацию NF-κB непрямо посредством связывания с CD44 или снижения или ингибирования передачи сигнала CD44 или взаимодействия с другими рецепторами, связанными с клеточной поверхностью. PRG4 можно вводить согласно вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем описании выше, в том числе посредством системного введения. Клетка может представлять собой клетку человека и, в частности, она может представлять собой иллюстративные клетки человека, описанные в настоящем описании в отношении изобретения.

В следующем варианте осуществления опосредуемое PRG4 снижение или ингибирование транслокации NF-κB приводит к снижению уровней провоспалительных цитокинов в крови и, таким образом, его можно использовать для лечения воспалительного состояния. Иллюстративные воспалительные состояния описаны на протяжении настоящей заявки.

Пример 1. Экспериментальные данные о том, что PRG4 выступает в качестве антагониста CD44 и ингибирует опосредуемые CD44 воспалительные каскады.

Для оценки взаимодействия между протеогликаном 4 человека и рецептором CD44 и последствия этого взаимодействия для индуцируемой провоспалительными цитокинами пролиферации синовиоцитов проводили следующие эксперименты.

Связывание rhPRG4 с CD44 и конкуренцию с высокомолекулярной гиалуроновой кислотой (HMW HA) оценивали с использованием прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и поверхностного плазмонного резонанса. Проводили расщепление rhPRG4 сиалидазой-A и O-гликозидазой и связывание CD44 оценивали с использованием ELISA. Фибробластоподобные синовиоциты ревматоидного артрита (RA-FLS) стимулировали интерлейкином-1 бета (IL-1β) или фактором некроза опухоли альфа (TNF-α) в течение 48 ч в присутствии или в отсутствие rhPRG4 или HMW HA в концентрации 20, 40 и 80 мкг/мл и определяли клеточную пролиферацию. Вклад CD44 оценивали посредством совместной инкубации с антителом против CD44 (IM7). Антипролиферативный эффект rhPRG4 исследовали после обработки PRG4-/- синовиоцитов посредством IL-1β или TNF-α в присутствии или в отсутствие IM7.

Переменные сначала исследовали в отношении нормальности и равных дисперсий. Переменные, которые удовлетворяли обеим гипотезам, исследовали в отношении статистической значимости с использованием t-критерия Стьюдента или дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки для двух групп и сравнения более чем двух групп соответственно. Переменные, которые не удовлетворяли гипотезе о нормальности, исследовали с использованием U-критерия Манна-Уитни или ANOVA по рангам. Уровень статистической значимости был установлен как $\alpha=0,05$. Данные графически представлены в качестве среднего значения+стандартное отклонение.

1A. Связывание rhPRG4, высокомолекулярного HA, HA средней молекулярной массы и витронектина с CD44 с использованием прямого ELISA.

Микропланшеты для титрования с высоким связыванием (Corning, Sigma Aldrich, США) покрывали rhPRG4 ($M_r \approx 240$ кДа), высокомолекулярным HA (HMW HA; $M_r \approx 1500$ кДа) (R & D System, США), HA средней молекулярной массы (MMW HA; $M_r \approx 300$ кДа) (R & D System) и витронектином ($M_r \approx 75$ кДа) (Sigma Aldrich) в дозе 400 мкг/мл в буфере PBS (100 мкл на лунку) в течение ночи при 4°C. rhPRG4 представляет собой полноразмерный продукт, продуцируемый клетками CHO-M (Lubris, Framingham, MA, США). После промывания PBS+0,1% Tween 20 лунки блокировали 2%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA; 300 мкл на лунку) в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. CD44-Fc IgG₁ (R & D systems) или Fc IgG₁ (R & D systems), каждый в дозе 1 мкг/мл (100 мкл на лунку), добавляли в планшет и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывания посредством PBS+0,1% tween 20 добавляли антитело против IgG₁Fc-HRP (Sigma Aldrich) в разведении 1:10000 (100 мкл на лунку) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывания PBS+0,1% tween 20 проводили развитие окраски анализируемой смеси с использованием 1-стадийного реагента Turbo TMB ELISA (ThermoScientific, США) и измеряли поглощение при 450 нм. Данные соответствуют среднему значению для 4 независимых анализов, каждый по три экземпляра лунок на группу.

Связывание rhPRG4, HMW HA, MMW HA и витронектина со слитым белком CD44-Fc IgG₁ и Fc IgG₁ представлено на фиг. 1A. Поглощение при 450 нм в группе CD44-Fc IgG₁ было значимо более высоким ($p < 0,001$), чем поглощение в группе Fc IgG₁ для лунок, покрытых rhPRG4, HMW HA и MMW HA. Напротив, не было значимых отличий между CD44-Fc IgG₁ и Fc IgG₁ в покрытых витронектином лунках.

Эти данные демонстрируют, что rhPRG4 связывает CD44 и препятствует связыванию HMW HA и CD44. rhPRG4, HMW HA и MMW HA специфически связываются с химерным CD44 с чрезвычайно низким неспецифическим связыванием. Напротив, витронектин, который обладает значительной гомологией последовательности с лубрицином, не демонстрирует какой-либо специфичности в отношении связывания CD44. Поскольку rhPRG4 связывает CD44, он может выполнять функцию антагониста CD44, тем

самым препятствуя провоспалительной передаче сигнала CD44.

1В. Зависимое от концентрации связывание rhPRG4, HMW HA, MMW HA с CD44 и конкуренция между rhPRG4 и HA в отношении связывания с CD44 с использованием прямого ELISA.

Зависимое от концентрации связывание rhPRG4, HMW HA и MMW HA с CD44 проводили путем покрытия микропланшетов для титрования 400, 200, 100, 20, 4, 2 и 0,1 мкг/мл макромолекул. Анализ проводили, как описано выше. Величины поглощения в лунках Fc IgG₁ вычитали из величин поглощения в лунках CD44-Fc IgG₁ и величину поглощения CD44-Fc IgG₁ с внесенной поправкой нормализовали к величинам группы 400 мкг/мл rhPRG4, и данные выражали в качестве процентного связывания с CD44. Зависимое от концентрации связывание rhPRG4, HMW HA и MMW HA с рекомбинантным CD44 представлено на фиг. 1В. Процентное связывание рекомбинантного CD44 было значимо более высоким ($p < 0,001$) в покрытых rhPRG4 лунках по сравнению с лунками, покрытыми HMW HA или MMW HA, для концентраций 400, 100, 20, 4 и 2 мкг/мл. Кроме того, процентное связывание рекомбинантного CD44 было значимо более высоким ($p < 0,001$) в покрытых rhPRG4 лунках по сравнению с покрытыми MMW HA лунками для концентрации 200 мкг/мл. Не было значимых отличий в процентном связывании CD44 между лунками, покрытыми rhPRG4, HMW HA и MMW HA в концентрации 0,1 мкг/мл. Данные соответствуют среднему значению для 4 независимых анализов, каждый по три экземпляра лунок на группу.

Для оценки конкуренции между rhPRG4 и либо HMW HA, либо MMW HA в отношении связывания с CD44 микропланшеты для титрования покрывали либо CD44-Fc IgG₁, либо Fc IgG₁ в дозе 1 мкг/мл (100 мкл на лунку) в течение ночи при 4°C. Затем лунки промывали PBS+0,1% tween 20 и лунки блокировали с использованием 2% BSA (300 мкл на лунку) в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. В лунки добавляли либо rhPRG4 в концентрации 5 мкг/мл, либо комбинацию rhPRG4 (5 мкг/мл) и HMW HA или MMW HA в количестве 0,01, 0,05, 0,25, 1, 5 или 50 мкг/мл (100 мкл на лунку) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. После промывания PBS+0,1% tween 20 добавляли специфичное к лубрицину моноклональное антитело (Mab 9G3) в дозе 1:1000 (100 мкл на лунку) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После промывания PBS+0,1% tween 20 добавляли антитело козы против IgG мыши-HRP (Thermo Scientific) в разведении 1:1000 (100 мкл на лунку) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Развитие окраски в анализе проводили, как описано выше. Величины поглощения в лунках Fc IgG₁ вычитали из величин поглощения в лунках CD44-Fc IgG₁, и величину поглощения с внесенной поправкой в группах rhPRG4+HA нормализовывали к величинам поглощения в группе rhPRG4, и данные выражали в качестве процентного связывания с CD44. Данные представляют собой среднее значение для 4 независимых анализов, каждый по три экземпляра лунок на группу.

Конкуренция между rhPRG4 и HMW HA или MMW HA в отношении связывания с рекомбинантным CD44 представлена на фиг. 1С. HMW HA или MMW HA в концентрациях 0,05, 0,25, 1, 5 и 25 мкг/мл на значимом уровне снижали связывание rhPRG4 с CD44 ($p < 0,05$).

Эти данные демонстрируют, что rhPRG4 связывается с CD44 зависимым от концентрации образом с аффинностью, сравнимой с HMW HA. Более того, rhPRG4 конкурирует с HMW HA за связывание с CD44. Присутствие избытка HMW или MMW HA снижало связывание rhPRG4 с CD44 только приблизительно на 50%. Эти данные указывают на то, что rhPRG4 является антагонистом CD44; таким образом, он имеет потенциал к препятствованию провоспалительной передаче сигнала CD44.

1С. Зависимое от концентрации связывание rhPRG4 с CD44 и конкуренция между rhPRG4 и HMW HA при использовании поверхностного плазмонного резонанса.

Связывание rhPRG4 с CD44-IgG1Fc исследовали с использованием поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T100, GE Healthcare Lifesciences, NJ, США) (см. фиг. 1С). Чипы Series S функционализировали с использованием набора для улавливания антител человека (GE Life Sciences) и либо CD44-Fc IgG₁, либо Fc IgG₁ позволяли связаться с поверхностью функционализированных чипов в проточной ячейке 1 (Fc₁) и проточной ячейке 2 (Fc₂) соответственно. rhPRG4 инжестрировали в количестве 30 мкл/мин в течение 8 мин в концентрациях 300, 250, 200, 150, 100 и 50 мкг/мл с последующей диссоциацией в течение 10 мин с использованием 0,1 М HEPES, 1,5 М NaCl, 30 мМ EDTA и 0,5% P20 (GE Life Sciences). Поверхность чипа регенерировали в конце каждого цикла импульсной обработкой 3 М MgCl₂ в течение 1 мин. Каждую концентрацию анализируемого соединения инжестрировали в двух экземплярах. Полученные кривые подвергали двойному сравнению (т.е. Fc₂-Fc₁, а затем вычитание кривой 0 мкг/мл). Кинетику связывания и аффинность связывания определяли с использованием программного обеспечения BiaEvaluation с использованием модели связывания 1:1/конформационного изменения или посредством равновесия в стационарном состоянии соответственно. Для исследования конкуренции между rhPRG4 и HMW HA в отношении связывания с CD44 rhPRG4 инжестрировали в концентрациях в диапазоне от 0 до 300 мкг/мл, как описано выше. После завершения фазы диссоциации HMW HA инжестрировали в количестве 50 мкг/мл (30 мкл в минуту) в течение 1 мин. Затем сигналы связывания с двойным сравнением для rhPRG4 (в различных концентрациях) с CD44 наносили на график против сигналов связывания, сгенерированных связыванием HMW HA с CD44 после инъекции rhPRG4.

Связывание rhPRG4 с рекомбинантным CD44 подтверждали с использованием поверхностного плазмонного резонанса. rhPRG4 демонстрировал зависимую от концентрации ассоциацию с и диссоциа-

цию от иммобилизованного CD44-Fc IgG₁ (фиг. 2А) с кажущейся $K_d=38$ нМ, исходя из молекулярной массы rhPRG4 240 кДа. rhPRG4 препятствовал связыванию HMW HA с рекомбинантным CD44, как показано по обратной связи между интенсивностью сигнала связывания HMW HA (ось x) и интенсивностью сигнала связывания rhPRG4 (ось y) (фиг. 2В).

Эти данные демонстрируют, что rhPRG4 связывается с CD44 зависимым от концентрации образом со сравнимой аффинностью с HMW HA. Кроме того, как продемонстрировано в примере 1В и 1С, присутствие rhPRG4, связанного с CD44, препятствовало связыванию HMW HA с CD44 зависимым от концентрации образом и может указывать на то, что rhPRG4 и HMW HA обладают общим участком связывания на рецепторе. Ожидается, что в окружении сустава, где концентрация HA SF приблизительно в 10 раз выше, чем концентрация лубрицина, и исходя из данных конкурентного связывания, представленных в настоящем описании, лубрицин будет способен связываться с CD44 на поверхности синовиоцитов и хондроцитов и демонстрировать опосредуемую CD44 биологическую функцию в присутствии HA, тем самым обеспечивая гомеостатическую роль в суставах путем препятствования медиаторам, которые в ином случае стимулируют воспаление.

1D. Влияние удаления гликозилирования домена муцина на связывание rhPRG4 с CD44.

Способность лубрицина к пограничному связыванию опосредуется O-связанными олигосахаридами (β 1-3) Gal-GalNAc (Jay et al., *Glucosconj J* 2001; 18(10):807-15). Комбинация расщепления нейраминидазой и бета-1,3, 6 галактозидазой снижала способность лубрицина к пограничному связыванию на 50% (Jay et al., *Glucosconj J* 2001; 18(10):807-15). Лубрицин, выделенный из образцов RA SF, содержит увеличенные структуры центральной части гликозилирования 1 и демонстрирует сульфатированный эпитоп, который предположительно является частью лиганда L-селектина (Estrella et al., *Biochem J* 2010; 429(2):359-67). Кроме того, лубрицин из RA SF связывает L-селектин зависимым от гликозилирования образом и покрывает полиморфноядерные гранулоциты, привлеченные к воспаленной синовиальной оболочке и SF пациентов с RA (Jin et al. *J Biol Chem* 2012; 287 (43): 35922-33).

rhPRG4 расщепляли с использованием сиалидазы А (Prozyme, США), O-гликозидазы (New England Biolabs, США) или комбинации сиалидазы А и O-гликозидазы в течение 16 ч при 37°C. При расщеплении сиалидазой А 12 мкл фермента (1 Е/200 мкл) добавляли к rhPRG4 в общем объеме реакции 180 мкл и конечной концентрации rhPRG4 300 мкг/мл. При расщеплении O-гликозидазой 4,8 мкл фермента (40 млн ед./мл) добавляли к rhPRG4 в общем объеме реакционной смеси 180 мкл и конечной концентрации rhPRG4 300 мкг/мл в неденатурирующих условиях. При расщеплении сиалидазой-А и O-гликозидазой ферменты использовали в объемах, идентичных объемам, указанным выше, и инкубировали с rhPRG4 в общем объеме реакции и конечной концентрации rhPRG4, как указано выше. Эффект расщепления сиалидазой-А и O-гликозидазой на кажущуюся молекулярную массу rhPRG4 определяли посредством SDS-PAGE с использованием 4-12% Bis-Tris геля (NuPage, life technologies, США). Всего 20 мкл rhPRG4 или расщепленного ферментом rhPRG4 разделяли в восстанавливающих условиях (200 мВ в течение 60 мин) с последующим окрашиванием с использованием синего красителя Gelcode (Thermo Scientific, США). Связывание ферментативно расщепленного rhPRG4 с CD44 сравнивали с нерасщепленным rhPRG4 с использованием подхода прямого ELISA, описанного выше и с использованием концентрации rhPRG4 для покрытия 30 мкг/мл. Данные соответствуют среднему значению для 4 независимых экспериментов по три экземпляра лунок на группу. Расщепление сиалидазой-А приводило к значимому увеличению ($p<0,001$) процентного связывания rhPRG4 с CD44 по сравнению с необработанным контролем, как показано на фиг. 3А. Аналогично, расщепление O-гликозидазой приводило к значительному увеличению ($p=0,008$) процентного связывания rhPRG4 с CD44 по сравнению с необработанным контролем. Не было значимых отличий в процентном связывании CD44 между расщепленным сиалидазой-А и расщепленным также и O-гликозидазой rhPRG4 ($p=0,105$). Процентное связывание с CD44 расщепленного сиалидазой-А и O-гликозидазой rhPRG4 было значимо более высоким, чем процентное связывание расщепленного сиалидазой-А rhPRG4 ($p=0,007$), расщепленного O-гликозидазой rhPRG4 ($p<0,001$) и необработанного контроля ($p<0,001$). Расщепление rhPRG4 сиалидазой-А и O-гликозидазой приводило к снижению кажущейся молекулярной массы rhPRG4 до приблизительно 200 кДа (фиг. 3В).

Удаление сиаловой кислоты и O-гликозилирования значимо повышало связывание CD44 с rhPRG4 ($p<0,001$). Обработка сиалидазой-А и O-гликозидазой по отдельности приводила к повышению связывания rhPRG4 с рецептором CD44. Совокупное расщепление сиалидазой-А и O-гликозидазой приводило к еще более значимому связыванию rhPRG4 с CD44 по сравнению с расщеплением индивидуальными ферментами. Сиалидаза-А отщепляет разветвленные и неразветвленные концевые остатки сиаловой кислоты от гликопротеинов, в то время как O-гликозидаза катализирует удаление центральных частей 1 и 2 из гликопротеинов. Усиление связывания CD44 указывает на то, что ни гликозилирование центральной части 1, ни концевые остатки сиаловой кислоты не требуются для связывания rhPRG4 с CD44. Таким образом, уровень сиалирования и гликозилирования центральной части 1 на центральной части белка rhPRG4 не является существенным для способности PRG4 связывать CD44. Напротив, удаление этих остатков может приводить к конформационному изменению полужесткой стержневидной структуры rhPRG4, что приводит к усиленному взаимодействию с CD44.

1E. Индуцируемая провоспалительными цитокинами пролиферация фибробластподобных синовио-

цитов ревматоидного артрита и влияние обработки посредством rhPRG4 или HMW HA.

Синовиальная оболочка пациентов с РА содержит значительные количества изоформ CD44, и, как правило, они присутствуют на более высоком уровне по сравнению с ОА или нормальной синовиальной оболочкой (Naor et al., *Arthritis Res Ther* 2003;5(3):105-15; Grisar et al., *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30(1):64-72). Фибробластподобные синовиоциты ревматоидного артрита (RA-FLS) играют важную роль в инвазивности в синовиальную оболочку пациентов с РА. Экспрессия уникального варианта CD44 (CD44v7/8) вносит вклад в пролиферацию RA-FLS *in vitro* (Wibulswas et al., *Am J Pathol* 2000;157(6):2037-2044) и фармакологические средства, которые связывают CD44 клеточной поверхности с последующим отделением рецептора, продемонстрировали эффективность в экспериментальных моделях артрита Runnels et al. *Adv Ther* 2010; 27(3):168-80).

Для проведения этих экспериментов использовали фибробластподобные синовиоциты ревматоидного артрита (RA-FLS; Cell Applications, США) между 3-м и 6-м пассажами. В стерильных 96-луночных планшетах RA-FLS (5000 клеток на лунку в 80 мкл) культивировали в DMEM, дополненной 1% FBS и 1 mM пируватом, и стимулировали рекомбинантным интерлейкином-1 бета человека (IL-1 β ; R & D systems) в дозе 20 нг/мл или фактором некроза опухоли альфа (TNF- α ; R & D systems) в дозе 5 нг/мл в течение 48 ч при 37°C в отсутствие или в присутствии rhPRG4 или HMW HA в конечной концентрации 20, 40 или 80 мкг/мл. Общий объем в каждой лунке составлял 200 мкл. Пролиферацию клеток, являющуюся признаком воспаления, определяли с использованием раствора для анализа пролиферации клеток CellTiter 96 AQueous one (MTS; Promega, США) и определяли поглощение при 490 нм. Данные представлены в качестве кратности изменения поглощения при 490 нм по сравнению с необработанными контрольными RA-FLS. Данные соответствуют среднему значению для 3 независимых экспериментов по меньшей мере с тремя экземплярами лунок на обработку. Для оценки вклада CD44 в эффект rhPRG4 или HMW HA RA-FLS стимулировали IL-1 β или TNF- α , как описано выше. Обработку rhPRG4 или HMW HA проводили в конечной концентрации 80 мкг/мл в отсутствие или в присутствии IM7 (Abcam, США), нейтрализующего CD44 антитела, которое распознает консервативный эпитоп всех изоформ CD44 (Samson et al., *Exp Eye Res*, 2014; 127C:14-19) в конечном разведении 1:200. Общий объем в каждой лунке составил 200 мкл. Клеточную пролиферацию в экспериментальных группах определяли, как описано выше, и данные представлены в качестве кратности изменения поглощения при 490 нм по сравнению с необработанными контрольными RA-FLS. Данные соответствуют среднему значению для 3 независимых экспериментов по меньшей мере с тремя экземплярами лунок на обработку.

Индукцированная IL-1 β и TNF- α пролиферация RA-FLS в течение 48 ч представлена на фиг. 4А. Обработка 40 и 80 мкг/мл rhPRG4 или HMW HA значимо подавляла пролиферацию RA-FLS при стимуляции IL-1 β ($p < 0,05$). Обработка 20, 40 и 80 мкг/мл rhPRG4 значимо подавляла пролиферацию RA-FLS при стимуляции TNF- α ($p < 0,05$). Обработка HMW HA не приводила к подавлению пролиферации RA-FLS при стимуляции TNF- α . Совместная обработка с антителом против CD44 IM7 обращала вспять эффект rhPRG4 и HMW HA на стимулированные IL-1 β RA-FLS, как показано по отсутствию значимых отличий в изменении поглощения между стимулированными IL-1 β RA-FLS, обработанными rhPRG4+IM7 или HMW HA+IM7, и стимулированными IL-1 β RA-FLS, как показано на фиг. 4В. Аналогично, совместная обработка с антителом IM7 обращала вспять эффект rhPRG4 на индуцируемую TNF- α пролиферацию RA-FLS.

rhPRG4 и HMW HA в концентрации 40 и 80 мкг/мл на значимом уровне подавляли индуцируемую IL-1 β пролиферацию RA-FLS ($p < 0,05$). rhPRG4 в дозе 20, 40 и 80 мкг/мл на значимом уровне подавлял индуцируемую TNF- α пролиферацию RA-FLS ($p < 0,05$). Нейтрализация CD44 обращала вспять эффект rhPRG4 на стимулированные IL-1 β и TNF- α RA-FLS и эффект HMW HA на стимулированные IL-1 β RA-FLS.

IL-1 β и TNF- α индуцировали пролиферацию RA-FLS, причем более высокая клеточная пролиферация наблюдалась при стимуляции TNF- α , что согласуется с другими опубликованными сообщениями (например, Lacey et al. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1):103-109). rhPRG4 ингибировал индуцируемую IL-1 β и TNF- α пролиферацию RA-FLS в механизме, который вовлекает связывание CD44. Последующим эффектом взаимодействия rhPRG4 и CD44 является ингибирование транслокации NF- κ B в ядро. В этом анализе клеточной пролиферации HMW HA ингибировал индуцируемую IL-1 β пролиферацию RA-FLS, но не ингибировал индуцируемую TNF- α пролиферацию. Как и в случае обработки rhPRG4, эффект HMW HA обращался вспять посредством антитела против CD44, что указывает на роль CD44 в опосредовании этого эффекта.

Эти данные показывают, что rhPRG4 демонстрирует антипролиферативный противовоспалительный эффект на RA-FLS после стимуляции IL-1 β или TNF- α . Интересно, что концентрации rhPRG4, которые демонстрируют этот антипролиферативный эффект, как правило, являются более низкими, чем оптимальные концентрации rhPRG4, требуемые для обеспечения пограничного смазывания. Этот антипролиферативный эффект rhPRG4 опосредуется взаимодействием с CD44 и последующим ингибированием транслокации NF- κ B в ядро, что указывает на то, что терапевтически применяемый лубрицин может

смягчать эффекты провоспалительных цитокинов на пролиферацию вредоносных типов клеток через CD44-зависимый механизм.

1F. Эффект обработки rhPRG4 на транслокацию NF-κB в ядро после стимуляции RA-FLS посредством TNF-α.

RA-FLS (400000 клеток/лунка) культивировали и стимулировали TNF-α (5 нг/мл) и обрабатывали rhPRG4 (200 мкг/мл) или коммерчески доступным ингибитором транслокации NF-κB MG 132 (3 мкМ; Tocris Bioscience) в течение 24 ч в бессывороточной среде. Клетки собирали и проводили извлечение ядер с использованием коммерчески доступного набора (Thermo scientific). Тотальный белок измеряли с использованием набора с микробицинхоновой кислотой (BCA) (Thermo scientific) и использовали 3 мкг ядерного экстракта каждой экспериментальной группы. Субединицу p50 NF-κB выявляли в экстракте ядер с использованием коммерчески доступного набора для анализа связывания ДНК NFκB (Abcam). Данные представлены в виде кратности изменения уровней ядерного NF-κB по сравнению с необработанным контролем. Для оценки того, является ли ингибирование транслокации NF-κB посредством rhPRG4 зависимым от CD44, описанный выше эксперимент повторяли в присутствии или в отсутствие антитела против CD44 IM7 (разведение 1:1000). Данные соответствуют среднему значению для 3 независимых экспериментов по меньшей мере с тремя экземплярами лунок на обработку.

Обработка TNF-α приводила к значительной транслокации NF-κB в ядро по сравнению с необработанными контролями ($p < 0,001$) (фиг. 4C). Обработка rhPRG4 или ингибитором транслокации NF-κB MG132 на значимом уровне снижала транслокацию NF-κB в ядро по сравнению с обработанными TNF-α RA-FLS ($p < 0,001$). Транслокация NF-κB в ядро в группе TNF-α+rhPRG4+IM7 была значимо более высокой, чем транслокация NF-κB в группе TNF-α+rhPRG4 ($p < 0,001$), и она не отличалась на значимом уровне от группы TNF-α. Таким образом, антипролиферативный противовоспалительный эффект rhPRG4 опосредуется взаимодействием CD44 с последующим ингибированием транслокации NF-κB в ядро, что указывает на то, что rhPRG4 способен прямо снижать провоспалительные эффекты транслокации NF-κB в ядро посредством CD44-зависимого механизма.

1G. Выделение Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} синовиоцитов и иммуногистохимия CD44.

Синовиальную ткань получали от самцов Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} мышей (в возрасте 8-10 недель; 5-8 животных на генотип) и расщепляли ферментом проназой (2 мг/мл; Sigma Aldrich) в стерильном буфере HBSS в течение 30 мин при 37°C при встряхивании. После этого следовало расщепление коллагеназой типа I (1 мг/мл; Sigma Aldrich) в течение 4 ч при 37°C при встряхивании. Ферментативную реакцию останавливали с использованием DMEM+10% FBS. Клетки выращивали в DMEM+10%FBS, и Prg4^{-/-} синовиоциты использовали между 2-м и 4-м пассажами, в то время как Prg4^{+/+} синовиоциты использовали на их втором пассаже.

Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} синовиоциты выращивали в предметных стеклах с лунками (Thermo Scientific). Клетки фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 15 мин и промывали два раза буфером PBS. В клетках повышали проницаемость посредством 0,2% Triton X-100 в течение 10 мин и их промывали 3 раза посредством буфера PBS. Клетки блокировали 2% BSA в течение 30 мин. Синовиоциты инкубировали с антителом против CD44 IM7 (1:200) при 4°C в течение ночи. После промывания три раза посредством PBS, синовиоциты инкубировали с антителом козы против IgG крысы с Alexa Fluor 488 (Life Technologies) в разведении 1:400 в течение 1 ч в темноте. Все инкубации проводили при комнатной температуре, если нет иных указаний. После промывания посредством PBS в течение 5 мин добавляли среду для заливки Vectashield, содержащую DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA, США). Клетки визуализировали посредством флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 90i с использованием программного обеспечения для визуализации NIS Elements.

Иммуногистохимия CD44 Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} синовиоцитов представлена на фиг. 5A. Интенсивную зеленую флуоресценцию, указывающую на локализацию CD44 и незанятые эпитопы CD44, наблюдали для синовиоцитов Prg4^{-/-}. Альтернативно для Prg4^{+/+} синовиоцитов не наблюдали или наблюдали слабую зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что большинство рецепторов CD44 (эпитопы) были заняты или находились под антагонистическим действием нативной экспрессии Prg4. Обработка IL-1β и TNF-α приводила к значимому повышению пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов по сравнению с необработанными Prg4^{-/-} синовиоцитами ($p < 0,001$) (фиг. 5B). Напротив, только стимуляция IL-1β приводила к значимому повышению пролиферации Prg4^{+/+} синовиоцитов по сравнению с необработанными Prg4^{+/+} синовиоцитами ($p < 0,001$). Кроме того, кратное повышение индуцируемой IL-1β и TNF-α пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов было значимо более высоким, чем кратное повышение индуцируемой цитокинами пролиферации Prg4^{+/+} синовиоцитов ($p < 0,001$).

Обработка rhPRG4 значимо ингибировала индуцируемую IL-1β и TNF-α пролиферацию Prg4^{-/-} синовиоцитов ($p < 0,001$) (фиг. 5C). Совместная обработка с IM7 обращала вспять эффект rhPRG4. Это иллюстрируется значимым увеличением ($p < 0,001$) пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов в группах IL-1β+rhPRG4+IM7 и TNF-α+rhPRG4+IM7 по сравнению с IL-1β+rhPRG4 и TNF-α+rhPRG4 соответственно. Не было значимых отличий в пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов между группами TNF-α+rhPRG4+IM7

и TNF- α . Напротив, пролиферация Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов была значимо более высокой в группе IL-1 β , чем в группе IL-1 β +rhPRG4+IM7 ($p < 0,001$).

Мыши Prg4 $^{-/-}$ демонстрируют ранние признаки дегенерации хряща, на которую указывают поверхностные фибрилляции и повышенный коэффициент трения в суставах, по сравнению с мышами Prg4 $^{+/-}$ и Prg4 $^{+/+}$ (Jay et al., *Arthritis Rheum*, 2007; 56(11):3662-9). Кроме того, Prg4 $^{-/-}$ мыши демонстрирует увеличенное окрашивание активированных каспазой-3 хондроцитов в суставном хряще по сравнению с совпадающим по возрасту хрящом Prg4 $^{+/+}$ (Waller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110(15): 5852-7), и у Prg4 $^{-/-}$ мышей имеются признаки гиперплазии и избыточного роста без заметной синовиальной гиперплазии у Prg4 $^{+/-}$ или Prg4 $^{+/+}$ мышей (Rhee et al., *J. Clin. Invest*, 2005; 115(3):622-31). Prg4 $^{-/-}$ синовиоциты демонстрируют усиленное окрашивание CD44 по сравнению с Prg4 $^{+/+}$ синовиоцитами. Кроме того, провоспалительные цитокины индуцировали значительную пролиферацию Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов без заметного эффекта на Prg4 $^{+/+}$ синовиоциты. В совокупности это наблюдение указывает на продолжающееся воспаление Prg4 $^{-/-}$ суставов, причем фенотип пролиферирующих синовиоцитов напоминал фенотип RA-FLS. rhPRG4 ингибировал индуцируемую цитокинами пролиферацию Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов, и этот эффект опосредовался взаимодействием rhPRG4-CD44. Нейтрализация CD44 полностью обращала вспять антипролиферативный эффект rhPRG4 после стимуляции TNF- α и частично обращала вспять антипролиферативный эффект rhPRG4 после стимуляции IL-1 β . Это отличие, связанное с взаимодействием rhPRG4-CD44 в условиях стимуляции Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов посредством TNF- α и IL-1 β , потенциально может быть следствием способности rhPRG4 модулировать другие каскады передачи сигнала независимо от их способности взаимодействовать с CD44. Таким образом, rhPRG4 ингибирует индуцируемую IL-1 β и TNF- α пролиферацию Prg4 $^{-/-}$ синовиоцитов в механизме, который вовлекает CD44, и, таким образом, он является антагонистом CD44, способным подавлять провоспалительную активность передачи сигнала CD44.

Пример 2. Лубрицин модулирует продукцию воспалительных цитокинов в системах цельной крови человека.

Липополисахариды (LPS) находятся на наружной мембране грамотрицательных бактерий, и они индуцируют иммунные воспалительные ответы у животных. Эффект нагрузки LPS на продукцию воспалительных цитокинов исследовали в цитратной цельной крови человека с использованием технологии матриц Biochip Array для определения профиля образования различных цитокинов и модулирования их продукции. Образование IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, VEGF, IFN γ , TNF α , IL1a, IL1b, MCP1 и EGF исследовали в образцах цитратной цельной крови, дополненных физиологическим раствором (соотношение 1-10) и LPS в концентрации 10 мкг/мл в образцах, инкубированных в течение 60 мин при 37 $^{\circ}$ C. Эти смеси центрифугировали, и супернатант плазмы анализировали в отношении 14 биомаркеров воспаления с использованием высокочувствительной матрицы цитокинов на устройстве для считывания Randox Investigator Biochip reader. Эти исследования проводили в двух экземплярах, и они представлены в форме таблицы и фигуры. Как показано на фиг. 8А-В, добавление липополисахарида в разведении 1:10 к цельной крови приводило к повышению продукции воспалительных цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF- α , IL-1 β и MCP-1 в указанных условиях. Не было отмечено изменений IL2, IFN γ и IL1b. На фиг. 8В представлены процентные изменения различных параметров, отчетливо демонстрирующие заметное повышение уровней IL6, IL8, VEGF и TNF α .

С использованием того же подхода также исследовали эффект лубрицина на образование воспалительных цитокинов в цельной крови с использованием сходных условий эксперимента. В этих исследованиях эффект лубрицина (0,57 мг/мл) исследовали путем добавления его в цитратную цельную кровь, взятую от нормальных здоровых добровольцев. В образцах и солевом растворе, инкубированных в течение 60 мин, определяли профиль уровней воспалительных цитокинов. Цельную кровь центрифугировали с получением плазмы, в которой определяли профиль различных воспалительных цитокинов с использованием высокочувствительного анализа цитокинов. Как показано на фиг. 9А-В, добавление лубрицина в количестве 0,57 мг/мл к цельной крови приводило к снижению продукции IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 и EGF. Наиболее выраженное снижение наблюдали для VEGF, IL8, IL6 и IL10.

Эффект лубрицина на опосредуемое LPS образование воспалительных цитокинов исследовали с использованием технологии Biochip Array. В этих исследованиях LPS отдельно в количестве 10 нг/мл и предварительное добавление LPS в количестве 10 нг/мл с последующим добавлением лубрицина в количестве 0,57 мг/мл сравнивали в цитратной цельной крови в отношении образования различных воспалительных цитокинов. Все образцы инкубировали в течение 60 мин и центрифугировали с получением плазмы. Затем эту плазму анализировали с использованием биочипа в отношении воспалительных цитокинов. LPS добавляли к цельной крови в разведении 1:10. Как показано на фиг. 10А-В, присутствие лубрицина приводило к снижению уровня IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 и EGF, даже несмотря на то, что, как рассмотрено выше, присутствие LPS отдельно приводило к увеличению продукции каждого из этих цитокинов. Как показано на фиг. 10В, лубрицин приводил к выраженному снижению уровней EGF, IL10, VEGF, MCP1, IL1b и TNF. Эти данные указывают на то, что добавление лубрицина в значительной степени препятствует опосредуемому LPS образованию воспалительных цитокинов,

что указывает на то, что лубрицин обладает противовоспалительными свойствами.

Эффект лубрицина на опосредуемое TNF- α образование воспалительных цитокинов исследовали с использованием технологии Biochip Array. Рекомбинантный TNF- α использовали в качестве пускового фактора для образования воспалительных цитокинов в цельной крови. Эффект лубрицина исследовали в отношении опосредуемого TNF- α образования различных цитокинов. TNF- α отдельно в концентрации 100 мг/мл добавляли к цельной крови, которую инкубировали в течение 60 мин при 37°C. TNF- α добавляли к цельной крови в разведении 1:10. Модулирующие эффекты лубрицина на опосредуемое TNF- α образование различных цитокинов исследовали путем добавления лубрицина в количестве 0,57 мг/мл к цельной крови непосредственно перед добавлением TNF- α . Через 60 мин получали плазму посредством центрифугирования и анализировали в отношении воспалительных цитокинов с использованием матриц Randox Biochip. Как показано на фиг. 11A-B, присутствие лубрицина приводило к снижению уровней IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF- α , IL-1 β и EGF, даже несмотря на то, что нагрузка TNF- α отдельно приводила к продукции каждого из этих цитокинов. На фиг. 11B показано, что лубрицин снижал уровни цитокинов в диапазоне 10-100%. Наиболее выраженное снижение стимулированной TNF- α экспрессии цитокинов, как было обнаружено, представляло собой снижение при стимуляции IFN- γ и TNF- α (поскольку лубрицин, по-видимому, прерывал петлю положительной обратной связи для продукции TNF- α) по сравнению со стимуляцией в отсутствие лубрицина. Эти данные указывают на то, что введение лубрицина в значительной степени препятствует опосредуемому TNF- α образованию воспалительных цитокинов, что указывает на то, что лубрицин имеет противовоспалительные свойства.

Эффект лубрицина на опосредуемое рекомбинантным тканевым фактором (TF) образование воспалительных цитокинов исследовали с использованием технологии Biochip Array. В этих исследованиях использовали тканевый фактор торговой марки Recombiplastin (IL Laboratories) для запуска образования воспалительных цитокинов в цельной крови человека. Эффект лубрицина в дозе 0,57 мг/мл исследовали посредством добавления этого агента перед добавлением тканевого фактора к цельной крови. В качестве положительного контроля служил тканевый фактор отдельно. Образцы крови центрифугировали и извлекали плазму. Затем в этой плазме определяли профиль воспалительных цитокинов на чипах Randox Biochip. TF добавляли к цельной крови в разведении 1:10. Как показано на фиг. 12A-B, присутствие лубрицина приводило к снижению уровня IL-6, IL-8, VEGF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 и EGF, даже несмотря на то, что нагрузка TF отдельно приводила к продукции каждого из этих цитокинов. Как показано на фиг. 12B, лубрицин обеспечивал выраженное снижение уровней TNF- α и VEGF в образцах, к которым был добавлен тканевый фактор. Эти данные указывают на то, что введение лубрицина в значительной степени препятствует опосредуемому TF образованию воспалительных цитокинов, что показывает, что лубрицин обладает противовоспалительными свойствами.

Эти исследования показывают, что лубрицин способен ингибировать образование различных воспалительных цитокинов в цельной крови, в которую был добавлен бактериальный липополисахарид (LPS), TNF- α и тканевый фактор. Все эти средства являются медиаторами воспаления. Таким образом, лубрицин способен подавлять образование воспалительных цитокинов среди широкого множества медиаторов.

Пример 3. Лубрицин снижает уровни провоспалительных цитокинов *in vivo*.

Для определения того, может ли лубрицин модулировать уровни провоспалительных цитокинов *in vivo*, использовали модель на крысах. Девять крыс подвергали хирургической операции для дестабилизации медиального мениска (хирургическая операция DMM). Через семь суток после хирургической операции каждой крысе вводили однократную внутрисуставную дозу лубрицина 200 мкг/кг. Контрольным крысам проводили инъекцию равного объема физиологического раствора. Уровни цитокинов в образцах сыворотки, полученных от исследуемых мышей, сравнивали с контрольными мышами, которым проводили хирургическую операцию, но не вводили дозу лубрицина после операции. Образцы отбирали через 3 недели после введения дозы лубрицина и анализировали с использованием мультиплексной платформы Luminex. Результаты представлены на фиг. 13, где показаны измеренные уровни EPO, IL-13, IL-10, IL-18, IL-1 α , IL-2, MCSF, IL-1 β , IL-4, IFN- γ , MIP-3 α , GMCSF, IL-7, TNF- α , VEGF, MCP-1, IL-5, G-CSF, RANTES, IL-6, GRO, IL-17 α и IL-12p70. Уровни всех из IL-18, MCSF, MCP-1, RANTES и GRO были снижены у крыс, которым вводили лубрицин, по сравнению с крысами, которым инъецировали только физиологический раствор. Более конкретно, это показывает широкие противовоспалительные эффекты лубрицина, поскольку этот профиль воспалительных цитокинов отличался от преобладающего профиля TNF- α /IL-6/IL-8 в случае медиаторов LPS и TF (которые в основном не активировались в этой модели). Тем не менее, лубрицин был способен значительно снижать продукцию провоспалительных цитокинов *in vivo*.

Пример 4. Эффект лубрицина на уровни цитокинов, секретируемых остеоартритическими синовиоцитами человека.

Клетки синовиальной жидкости получали от здоровых пациентов и пациентов с остеоартритом (OA) и очищали по CD90+ после истощения иммунных клеток. Клетки высевали в количестве 10000 на лунку и суспендировали в среде, содержащей DMEM, инактивированный нагреванием FBS Nucleon

(10%) и Anti-Anti (1%). Анализы включали суспензию клеток (клетки+среда) в количестве 180 мкл и лиганды в количестве 20 мкл в общем объеме 200 мкл. Затем рекомбинантный лубрицин (rhPRG4) вводили в клетки в концентрации 90 мкг/мл, и отрицательный контроль представлял собой PBS. Затем планшет инкубировали при 37°C при 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего супернатанты собирали для анализа цитокинов посредством мультиплексной платформы Lumindex. Как показано на фиг. 14А-В, нормальные клетки не продемонстрировали никаких изменений в ответе цитокинов при сравнении условий лубрицина против PBS. Однако клетки ОА продемонстрировали подавление цитокинов FGF-2 и IL-1Ra, когда их подвергали воздействию лубрицина. Таким образом, в клетках, уже демонстрирующих воспалительный ответ, таких как остеоартритические клетки, исследованные в настоящем описании, обработка лубрицином обладает способностью снижать уровни провоспалительных цитокинов, экспрессируемых с этих клеток.

Пример 5. Лечение повреждения головного мозга.

При травме головы часто происходят ушибы тканей головного мозга и нарушение целостности сосудов, которое приводит к субарахноидальному кровоизлиянию и/или субдуральным гематомам. Следовательно, нейроны утрачиваются, что приводит к нарушению функции головного мозга. Кроме того, при СВА и ТИА образуется один или несколько внутрисосудистых сгустков, блокируя доставку кислорода и питательных веществ к клеткам головного мозга, в том числе к нейронам, в области головного мозга ниже блокады. Это также приводит к разрушению нейронов и, тем самым, к нарушению функции головного мозга. Иммуный ответ головного мозга на повреждение вовлекает увеличенную продукцию провоспалительных медиаторов и привлечение лейкоцитов в область повреждения. Это приводит к нейрональному повреждению в областях головного мозга на периферии области повреждения, называемому "полутенью", и усиливает повреждение головного мозга. Нейровоспаление является одним из ключевых механизмов вторичного повреждения, и является общеизвестным, что посттравматическое нейровоспаление вносит значительный вклад в нейрональное повреждение, возникающее после травматического повреждения головного мозга. Одним способом ограничения такого повреждения головного мозга является введение средств в течение короткого интервала времени (часы) после повреждения, тем самым снижая нейровоспаление и конечное нейрональное повреждение. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения rhPRG4, также известный как лубрицин, можно вводить системно через сосуды или в ходе хирургической операции для уменьшения давления в головном мозге в качестве средства для ограничения повреждения головного мозга. Обоснование для такого лечения представлено в результатах, приведенных ниже.

Приблизительно через один час после травматического повреждения головного мозга у крыс с использованием общепризнанной модели повреждения головного мозга, вовлекающей контролируемое воздействие на кору, rhPRG4 вводили внутривенно исследуемым крысам в приблизительной дозе 2,5 мг/кг. Контрольным крысам внутривенно вводили нормальный физиологический раствор (0,9% NaCl). Через одни сутки головной мозг извлекали и образцы церебральной коры, окружающей посттравматический очаг повреждения, анализировали с использованием вестерн-блоттинга. Анализ продемонстрировал, что rhPRG4 снижал посттравматическую продукцию провоспалительных медиаторов по сравнению с контролем.

Галектин 3, экспрессия которого в головном мозге быстро возрастала и поддерживалась на высоком уровне в течение длительного периода после травматического повреждения головного мозга, ингибировался на 74%. Также у крыс, которым вводили rhPRG4, наблюдали снижение на 60% величины посттравматического притока моноцитов в поврежденную паренхиму головного мозга по сравнению с крысами, которым вводили нормальный физиологический раствор, и rhPRG4 также существенно ослаблял (на 94%) посттравматический синтез матриксной металлопротеиназы 9 и ингибировал (на 64%) преобразование профермента матриксной металлопротеиназы 2 в его ферментативно активную форму. Кроме того, rhPRG4 снижал на 80% проницаемость гематоэнцефалического барьера, которую оценивали путем оценки уровня альбумина в травмированной ткани головного мозга.

Инъекция флуоресцентно-меченого rhPRG4 продемонстрировала, что он проникает в паренхиму головного мозга в поврежденных областях головного мозга, в то время как он полностью отсутствовал в неповрежденных областях головного мозга. Вместе с результатами исследований *in vitro*, вовлекающих моноцитарную клеточную линию THP-1, эти данные показывают, что rhPRG4 ограничивает силу посттравматического нейровоспаления как посредством прямого ингибирования хемотактической активности вторгшихся воспалительных клеток, так и посредством уменьшения продукции провоспалительных медиаторов и передачи ими сигнала.

Таким образом, rhPRG4 селективно нацеливается на поврежденные области головного мозга, снижая вероятность неспецифических фармакологических эффектов. Рекомбинантный hPRG4 с высокой эффективностью ограничивает силу нейровоспаления, вызванного травматическим повреждением головного мозга, посредством снижения посттравматической продукции провоспалительных медиаторов и притока воспалительных клеток. Также rhPRG4 демонстрирует уникальную способность стабилизировать гематоэнцефалический барьер. Открытие этого нового свойства rhPRG4 имеет большое значение для лечения повреждения головного мозга, поскольку дисфункция гематоэнцефалического барьера, на-

блюдаемая при повреждении головного мозга, приводит не только к гибели нейрона на острой стадии повреждения, но также к прогрессирующим нейродегенеративным изменениям в поврежденном головном мозге и, следовательно, к плохим неврологическим исходам.

Пример 6. Лечение воспалительного заболевания кишечника.

Воспалительное заболевание кишечника характеризуется опосредуемым цитокинами привлечением активированных Т-клеток, которое приводит к окислительному повреждению и изнашиванию эпителия кишечника. Согласно оценке у 25-40% людей с язвенным колитом (UC) или болезнью Крона может произойти прогрессирование до необходимости хирургической операции, такой как подвздошно-резервуароанальная реконструкция, или проктоколэктомия, при которой удаляют части толстого кишечника и прямой кишки. Обычные способы терапии включают противовоспалительные лекарственные средства широкого спектра, такие как кортикостероиды, антитела против TNF или более направленные антитела против интегринов, которые нацелены на предотвращение подвижности, обусловленной хомингом Т-клеток в кишечнике. Ни один из этих подходов не пригоден для длительной терапии вследствие серьезных побочных эффектов, таких как инфекции и злокачественная опухоль, которые сопровождают эти подходы. Напротив, рекомбинантный hPRG4 можно селективно применять для кишечника, чтобы как восполнить отсутствующий эпителиальный гликокаликс и локально снизить экспрессию цитокинов. Недавняя охарактеризация профиля цитокинов воспалительного заболевания кишечника преимущественно в ободочной кишке выявила увеличенный уровень TNF- α , GRO, CCL11 (эотаксин) при UC, IL-6 при болезни Крона и IL-8 как при UC, так и при болезни Крона, относительно контролей (Korolkova et al., Clin Med Insights Gastroenterol 2015 May 6;8:29-44). Было показано, что лубрицин значительно снижает экспрессию этих цитокинов. В одном варианте осуществления ghPRG4 вводят посредством клизмы или перорально: через зонд, посредством толстокишечной ирригации, путем питья раствора или через инкапсулированные пилюли (например, инкапсулирование микрочастиц, инкапсулирование наночастиц, инкапсулирование полимеров и т.д.). В качестве примера, введение клизмы объемом от 100 мл до 4 л с ghPRG4 в концентрациях в диапазоне от 10 до 200 мкг/мл, более предпочтительно в объемах от 200 до 500 мл в концентрациях от 50 до 150 мкг/мл, суспендированным в приемлемом для кишечника забуференном солевом растворе, восполняет гликокаликс, препятствует хомингу Т-клеток и подавляет экспрессию цитокинов в области вводимого лубрицина. Введение ghPRG4 приводит к улучшению функции эпителиального барьера, меньшей сосудистой проницаемости, меньшей чувствительности к протеазной активности и улучшенному всасыванию питательных веществ. В определенных вариантах осуществления цитрат магния или другое слабительное вводят вплоть до 24 ч перед введением лубрицина, после чего следует соответствующее голодание.

Пример 7. Лечение подагры.

В качестве модели подагры исследовали крыс, которым проводили инъекцию кристаллов урата натрия. Через 24 ч после введения кристаллов урата натрия у крыс развивалась боль в суставах. Двумя крысам вводили физиологический раствор, в то время как другим двум крысам проводили инъекцию ghPRG4 через 24 ч после введения кристаллов урата. Этих крыс исследовали каждые 12 ч с использованием способа фон Фрея. Этот способ определяет афферентное ощущение боли в результате воспаления сустава при касании лапы пораженной конечности тонкой нитевидной проволокой. Данные на фиг. 15 показывают, что крысы, которым вводили ghPRG4, имели меньшую боль, чем крысы, которым вводили плацебо.

В то время как предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и описаны в настоящем описании, специалистам в данной области понятно, что такие варианты осуществления предоставлены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены могут быть теперь проведены специалистами в данной области без отклонения от изобретения. Следует понимать, что при применении изобретения на практике можно использовать различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем описании. Подразумеваются, что приведенные ниже пункты формулы определения определяют объем изобретения, и что способы и структуры, входящие в объем этих пунктов формулы изобретения и их эквивалентов, охватываются ими.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из приведенного ниже описания его предпочтительных вариантов осуществления и из формулы изобретения. Эти и многие другие изменения и варианты осуществления изобретения станут очевидными специалисту в данной области после изучения описания и примеров.

Список последовательностей

<110> ЛУВРИС ЭЛЭЛСИ

<120> ПРИМЕНЕНИЕ PRG4 В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА

<130> LUB-024PC

<140> PCT/US2016/014952

<141> 2016-01-26

<150> 62/273,059

<151> 2015-12-30

<150> 62/107,799

<151> 2015-01-26

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1404

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Trp Lys Thr Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Leu Leu Ser Val
 1. 5 10 15

Phe Val Ile Gln Gln Val Ser Ser Gln Asp Leu Ser Ser Cys Ala Gly
 20 25 30

Arg Cys Gly Glu Gly Tyr Ser Arg Asp Ala Thr Cys Asn Cys Asp Tyr
 35 40 45

Asn Cys Gln His Tyr Met Glu Cys Cys Pro Asp Phe Lys Arg Val Cys
 50 55 60

Thr Ala Glu Leu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Ser Phe Glu Arg
 65 70 75 80

Gly Arg Glu Cys Asp Cys Asp Ala Gln Cys Lys Lys Tyr Asp Lys Cys
 85 90 95

Cys Pro Asp Tyr Glu Ser Phe Cys Ala Glu Val His Asn Pro Thr Ser
 100 105 110

Pro Pro Ser Ser Lys Lys Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Ser Gln Thr
 115 120 125

Ile Lys Ser Thr Thr Lys Arg Ser Pro Lys Pro Pro Asn Lys Lys Lys
 130 135 140

Thr Lys Lys Val Ile Glu Ser Glu Glu Ile Thr Glu Glu His Ser Val
 145 150 155 160

Ser Glu Asn Gln Glu Ser
 165 170 175

Ser Thr Ile Arg Lys Ile Lys Ser Ser Lys Asn Ser Ala Ala Asn Arg
 180 185 190

Glu Leu Gln Lys Lys Leu Lys Val Lys Asp Asn Lys Lys Asn Arg Thr
 195 200 205

Lys Lys Lys Pro Thr Pro Lys Pro Pro Val Val Asp Glu Ala Gly Ser
 210 215 220

Gly Leu Asp Asn Gly Asp Phe Lys Val Thr Thr Pro Asp Thr Ser Thr
 225 230 235 240

Thr Gln His Asn Lys Val Ser Thr Ser Pro Lys Ile Thr Thr Ala Lys
 245 250 255

Pro Ile Asn Pro Arg Pro Ser Leu Pro Pro Asn Ser Asp Thr Ser Lys
 260 265 270

Glu Thr Ser Leu Thr Val Asn Lys Glu Thr Thr Val Glu Thr Lys Glu
 275 280 285

Thr Thr Thr Thr Asn Lys Gln Thr Ser Thr Asp Gly Lys Glu Lys Thr
 290 295 300

Thr Ser Ala Lys Glu Thr Gln Ser Ile Glu Lys Thr Ser Ala Lys Asp
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Thr Ser Lys Val Leu Ala Lys Pro Thr Pro Lys Ala Glu
 325 330 335

Thr Thr Thr Lys Gly Pro Ala Leu Thr Thr Pro Lys Glu Pro Thr Pro
 340 345 350

036291

Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Ser Thr Thr Pro Lys Glu Pro Thr Pro
 355 360 365
 Thr Thr Ile Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
 370 375 380
 Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
 405 410 415
 Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro
 420 425 430
 Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
 435 440 445
 Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Thr Pro Thr Thr Pro
 450 455 460
 Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys
 465 470 475 480
 Glu Pro Ala Pro Thr Ala Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys
 485 490 495
 Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
 500 505 510
 Glu Pro Ser Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
 515 520 525
 Ser Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser
 530 535 540
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ser Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro
 545 550 555 560
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro
 565 570 575
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 580 585 590
 Ala Pro Thr Thr Thr Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 595 600 605
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Leu
 610 615 620
 Thr Pro Thr Thr Pro Glu Lys Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Lys Pro
 625 630 635 640
 Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro
 645 650 655
 Thr Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Ala Ala
 660 665 670
 Ala Pro Asn Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 675 680 685
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr
 690 695 700
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Leu Lys Glu Pro
 705 710 715 720
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys Glu Leu Ala Pro Thr
 725 730 735
 Thr Thr Lys Glu Pro Thr Ser Thr Thr Cys Asp Lys Pro Ala Pro Thr
 740 745 750
 Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
 755 760 765
 Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr
 770 775 780
 Thr Leu Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys
 785 790 795 800
 Glu Leu Ala Pro Thr Thr Thr Lys Gly Pro Thr Ser Thr Thr Ser Asp

036291

Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe Lys
 1250 1255 1260

Arg Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val
 1265 1270 1275

Gln Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr
 1280 1285 1290

Gly Glu Thr Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile
 1295 1300 1305

Gly Pro Ser Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala
 1310 1315 1320

Arg Leu Ala Tyr Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys
 1325 1330 1335

Val Ser Ile Leu Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala
 1340 1345 1350

Ile Ser Leu Pro Asn Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr
 1355 1360 1365

Ala Phe Ser Lys Asp Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg
 1370 1375 1380

Thr Ala Arg Ala Ile Thr Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys
 1385 1390 1395

Val Trp Tyr Asn Cys Pro
 1400

<210> 2
 <211> 5041
 <212> MHK
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 gggccgga ctattcggta cctgaaaaca acgatggcat gaaaaaacct tcccatttac 60
 ctgtgttgc tgctgtctgt tttcgtgatt cagcaagttt catctcaaga tttatcaagc 120
 tgtgcagga gatgtggga aggtattct agagatgcca cctgcaactg tgattatac 180
 tgtcaacct acatggagtg ctgccctgat ttcaagagag tctgcaactgc ggagctttcc 240
 tgtaaggcc gctgcttga gtccttcgag agagggagg agtgtgactg cgacgcccaa 300
 tgtaagaagt atgacaagt ctgtcccgat tatgagagtt tctgtgcaga agtgcataat 360
 cccacatcac caccatcttc aaagaaagca cctccacctt caggagcacc tcaaacctac 420
 aatcaacaa ccaaacgttc acccaaacca ccaacaaga agaagactaa gaaagtata 480
 gaatcagag aaataacaga agaacttct gtttctgaaa atcaagagtc ctctcctcc 540
 tctctctct cctctcttc ttcaacaatt tggaaaatca agtcttccaa aaattcagct 600
 gctaatagag aattacagaa gaaactcaa gtaaaagata acaagaagaa cagaactaaa 660
 aagaacctc ccccccaacc accagtgtga gatgaagctg gaagtggatt ggacaatggt 720
 gacttcaagg tcaacaactc tgacacgtct accaccaaca caataaaat cagcacatct 780
 cccaagatca caacagcaa accaataaat cccagaccca gtcttccacc taattctgat 840
 acatctaaag agcgtcttt gacagtgaat aaagagacaa cagttgaaac taagaaaact 900
 actacaacaa ataacagac ttcaactgat gaaaagaga agactacttc cgttaaagag 960
 acacaaagta tagagaaaac atctgctaaa gatttagcac ccacatctaa agtgcaggct 1020
 aaactacac ccaagctga aactacaacc aaaggccctg ctctcaccac tcccaaggag 1080
 cccaagccca ccaactccaa ggagcctgca tctaccacac ccaagagcc cacactacc 1140
 accatcaagt ctgcaaccac ccccccaag gagcctgca ccaaccacc caagtctgca 1200
 cccaccactc ccaaggagcc tgcacccacc accaccaagg agcctgcaacc caccactccc 1260
 aaggagcctg caccaccacc caccaaggag cctgcaacca ccaaccacaa gtctgcaacc 1320
 accactccca aggagcctgc acccaaccacc ccaagaagc ctgccccaac taccoccaag 1380
 gagcctgca ccaactctc caaggagcct acaccacca ctccaagga gctgcaacc 1440
 accaccaag agcctgcaacc caccactccc aaagagcctg caccactgca cccaagaag 1500
 cctgccccaa ctacccccaa ggagcctgca cccaccactc ccaaggagcc tgcaaccacc 1560
 accaccaag agccttcaacc caccactccc aaggagcctg caccaccacc caccaagtct 1620
 gcaaccacca ctaccaagga gctgcaacc accactacca agtctgcaacc caccactccc 1680
 aaggagcctt caccaccacc caccaaggag cctgcaacca ccaactccaa ggagcctgca 1740
 cccaccacc ccaagaagcc tgcoccaact accccaagg agcctgcaacc caccactccc 1800
 aaggaacctg caccaccacc caccaagaag cctgcaacca cogtccccaa agagcctgca 1860
 ccaactacc ccaaggagac tgcacccacc accccaaga agctcagccc caccacccc 1920

gagaagctcg caccaccac ccctgagaag ccgcaccca ccacccotga ggagctcgca 1980
cccaccacc ctgaggagcc cacaccacc acccctgagg agcctgctcc caccactccc 2040
aaggcagcgg ctcccaaac ccctaaggag cctgctccaa ctaccotaa ggagcctgct 2100
coaactacc ctaaggagcc tgcctcaact acccctaagg agactgctcc aactaccctt 2160
aaagggactg ctccaactac cctcaaggaa cctgcaacca ctactcccaa gaagcctgcc 2220
ccaagggagc ttgcaccacc caccaccaag gagccacat ccaccacotc tgacaagccc 2280
gtccaacta cccctaaggg gactgctcca actaccetta aggagcctgc tocaactacc 2340
cotaaggagc ctgctcaaac taccctaagg gggactgctc caactacotc caaggaacct 2400
gcaccacta ctccaagaa gcctgcccc aaggagcttg caccaccacc caccaagggg 2460
ccacatcca ccactctga caagcctgct ccaactacac ctaaggagac tgcctcaact 2520
acccccagg agcctgcacc cactaccccc aagaagcctg ctccaactac tcttgagaca 2580
cctctccaa ccacttcaga ggtctctact ccaactacca ccaaggagcc taccactatc 2640
cacaaaagcc ctgatgaac aactcctgag ctttctgcag aaccacacc aaaagctctt 2700
gaaaacagtc ccaaggaacc tgggtgacct acaactaaga ctctgcagc gactaaacct 2760
gaaatgacta caacagtaa agacaagaca acagaagag acttacgtac tacacctgaa 2820
actacaactg ctgcacctaa gatgacaaa gagacagcaa ctacaacaga aaaaactacc 2880
gaatccaaaa taacagctac aaccacaaa gtaacatcta ccaactca agataccaca 2940
cattcaaaa ttaactactt taaaacaact actcttgac ccaagtaac tacaacaaaa 3000
aagacaatta ctaccactga gattatgaac aaacctgaag aaacagtaa accaaaagac 3060
agagctacta attcctaagc gacaactcct aaacctcaaa agccaaccaa agcaccocaa 3120
aaaccactt ctaccacaaa gccaaaaca atgcctagag tgagaaaacc aaagacgaca 3180
ccaactcccc gcaagatgac atcaacaatg ccagaattga accctacotc aagaatagca 3240
gaagccatgc tccaaaccac caccagacct aaccacactc caaactocaa actagttaga 3300
gtaaatccaa agagtgaaga tgcaggtggt gotgaaggag aaacacotca tatgcttctc 3360
agggcccatg tgttcatgcc tgaagttact cccgacatgg attacttacc gagagtacc 3420
aatcaaggca ttatcatcaa tcccatgctt tccgatgaga ccaatatag caatggtaag 3480
ccagtagatg gactgactac tttgcgaat gggacattag ttgcattcog aggtcattat 3540
ttctggatgc taagtcatt cagtccacca tctccagctc gcagaattac tgaagtttgg 3600
ggtattcctt ccccattga taactgtttt actaggtgca actgtgaagg aaaaactttc 3660
ttctttaagg attctcagta ctggcgtttt accaatgata taaaagatgc aggttaccoc 3720
aaaccaattt tcaaggatt tggaggacta actggacaaa tagtggcagc gctttcaaca 3780
gctaaatata agaactggcc tgaatctgtg tattttttca agagaggtgg cagcattcag 3840
cagtataatt ataacagga acctgtacag aagtgcctcg gaagaaggcc tgctctaaat 3900
tatccagtgat atggagaaat gacacaggtt aggagacgto gctttgaacg tgctatagga 3960
ccttctcaaa cacacacat cagaattcaa tattccactg ccagactggc ttatcaagac 4020
aaaggtgctc ttcataatga agttaaagtg agtatactgt ggagaggact tccaaatgtg 4080
gttacctcag ctatatcact gcccaacatc agaaaacctg acggctatga ttactatgcc 4140
ttttctaaag atcaatacta taacattgat gtgcctagta gaacagcaag agcaattact 4200
actggtctg ggcagacctt atccaaagtc tggtaacaact gtccttagac tgatgagcaa 4260
aggagagtc aactaatgaa gaaatgaata ataattttg acaactgaaa acattttatt 4320
aataaagaat atgacatga gtataccagt ttatatataa aaatgttttt aaacttgaca 4380
atcattacac taaacagat ttgataatct tattcacagt tgttattgtt tacagacct 4440
ttaattaata tttctctgt ttattctcc totocctcc attgcatgpc toaacctgt 4500
aaaagaaaaa agaatcaaat tgaatatatc ttttaagaat tcaaaaactg tttatcact 4560
taccctagtt cattataaaa aatatctagg cattgtggat ataaaactgt tgggtattct 4620
acaactcaa tggaaattat tacaagcaga ttaaccctc tttttgac acaagtacaa 4680
tctaaaagtt atattggaaa acatggaaat attaaaattt tacactttta ctagctaaaa 4740
cataatcaca aagctttatc gtgtgtgata aaaaaattaa caatataatg gcaataggta 4800
gagatacaac aaatgaatat aacactataa cacttcatat tttccaaatc ttaatttggg 4860
tttaaggaag aaatcaataa atataaaata taagcacata tttattatat atctaaggta 4920
tacaatctg tctacatgaa gtttacagat tggtaaatat cacctgctca acatgtaatt 4980
atthaataaa actttggaac attaaaaaaa taaattggag gcttaaaaaa aaaaaaaaaa 5040
a 5041

<210> 3
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 3
Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
1. 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения или ингибирования воспалительного ответа у пациента, имеющего воспалительное состояние, причем способ включает введение пациенту PRG4, где воспалительное состояние выбрано из группы, состоящей из угревой сыпи; острой недостаточности органов; острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS); болезни Аддисона; аллергического ринита; отторжения аллотрансплантата; очаговой алопеции; болезни Альцгеймера; анафилаксии; аппендицита; астмы; атеросклероза; атопического дерматита; аутоиммунной алопеции; аутоиммунного заболевания; аутоиммунного гипертиреоза; аутоиммунного гипопитуитаризма; аутоиммунного плюригландулярного заболевания; болезни Бехчета; повреждения головного мозга; бронхита; злокачественной опухоли; реперфузионного синдрома; кардиоренального синдрома; глютеновой болезни; хронического актинического дерматита; хронического обструктивного заболевания легких (COPD); хронической почечной недостаточности; колита; болезни Крона; дерматомиозита; диабета; экземы; эмфиземы; отторжения инородного тела; глаукомы; гломерулонефрита; подагры; реакции "трансплантат против хозяина"; болезни Грэйвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; септической лихорадки; гепаторенального синдрома; миозита с тельцами включения; инфекции вследствие вирусной, грибковой, паразитарной или микробной инфильтрации; воспалительного заболевания кишечника; воспалительного заболевания почек; повреждения после термического или химического воздействия или облучения; синдрома раздраженной кишки; ишемии; воспаления легких; кольцевидной склеродермии; рассеянного склероза; фунгоидного микоза; инфаркта миокарда; некроза; неинфекционного повреждения легких; панкреатита; пернициозной анемии; пневмонии; полимиозита; простатита; псевдоподагры; ладонно-подошвенного пустулеза; гангренозной пиодермии; склеродермии; сепсиса; сывороточной болезни; синдрома Сезари; инсульта; синдрома системного воспалительного ответа (SIRS); системной красной волчанки; системной склеродермии; заболеваний, обусловленных гиперчувствительностью, опосредуемой Т-клетками; отторжения трансплантата; травмы, в том числе вследствие пулевого ранения, ножевого ранения, автомобильной катастрофы, падения или драки; туберкулеза; язвенного колита; крапивницы; перикардита и витилиго.

2. Способ по п.1, в котором PRG4 вводят пациенту системно.

3. Способ по п.2, в котором введение является внутривенным, внутривнутрибрюшинным, ингаляционным, внутримышечным, подкожным, пероральным, ректальным, буккальным или сублингвальным.

4. Способ по п.1, в котором PRG4 вводят пациенту локально.

5. Способ по п.4, в котором PRG4 вводят местным путем или посредством инъекции.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором PRG4 представляет собой экзогенный PRG4 человека.

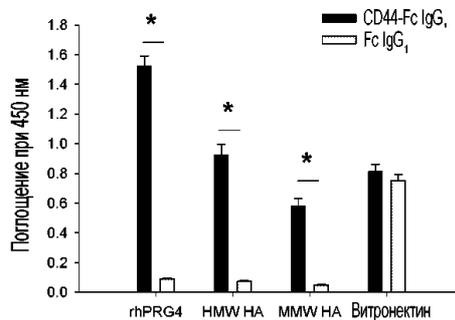
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором PRG4 представляет собой рекомбинантный PRG4 человека.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором PRG4 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 без сигнальной последовательности.

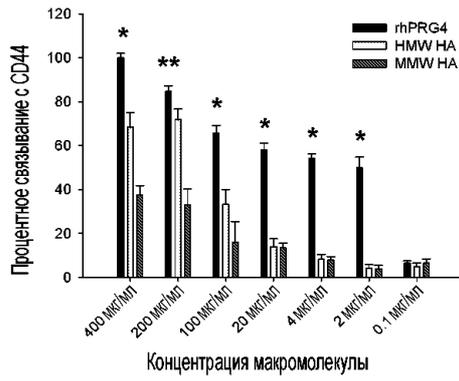
9. Способ по п.1, где воспалительным заболеванием является повреждение головного мозга.

10. Способ по п.1, где воспалительным заболеванием является воспалительное заболевание кишечника.

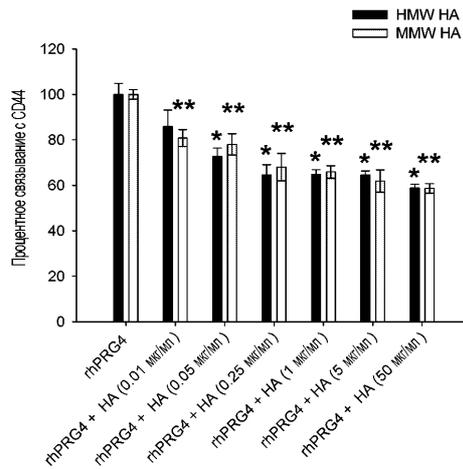
11. Способ по п.1, где воспалительным заболеванием является подагра.



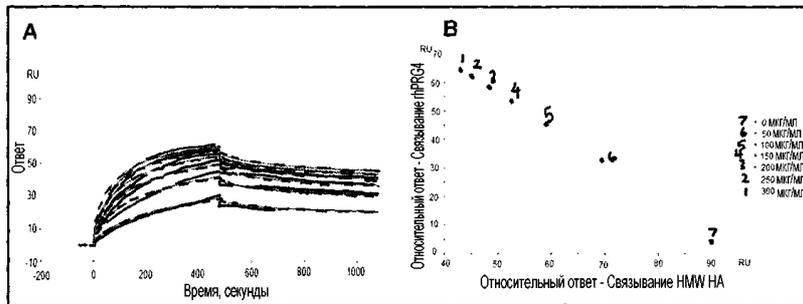
Фиг. 1А



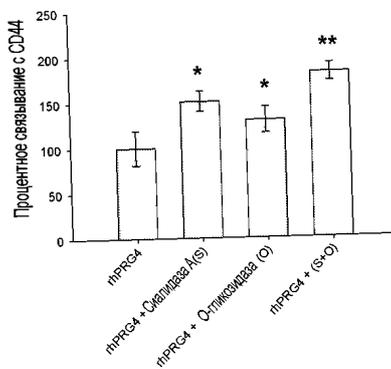
Фиг. 1B



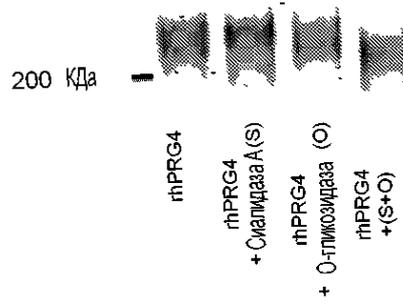
Фиг. 1C



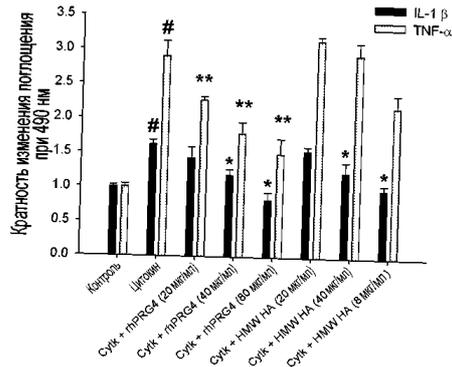
Фиг. 2A-2B



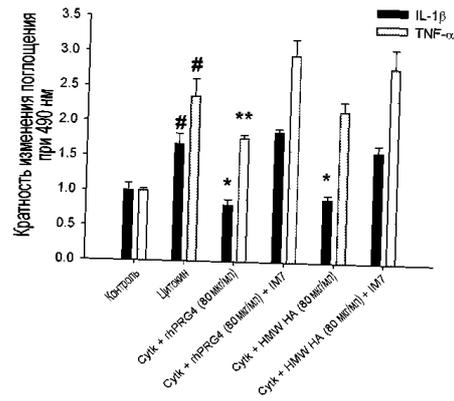
Фиг. 3A



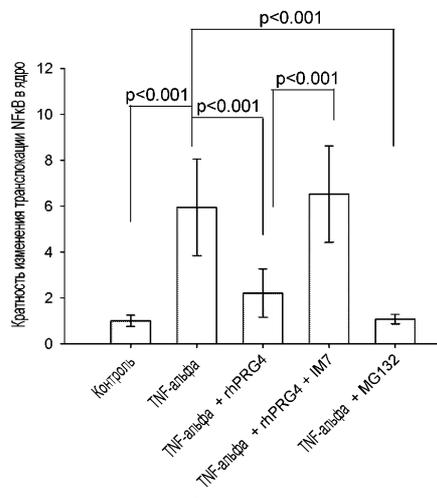
Фиг. 3В



Фиг. 4А

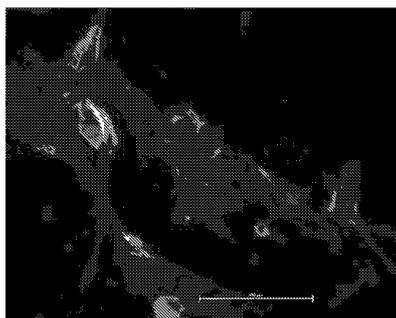


Фиг. 4В

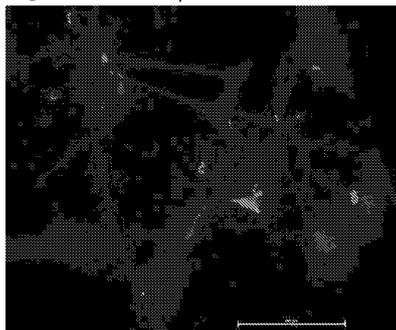


Фиг. 4С

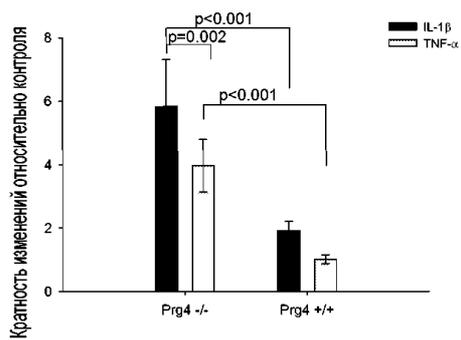
Prg4 ^{-/-} Синовиоциты



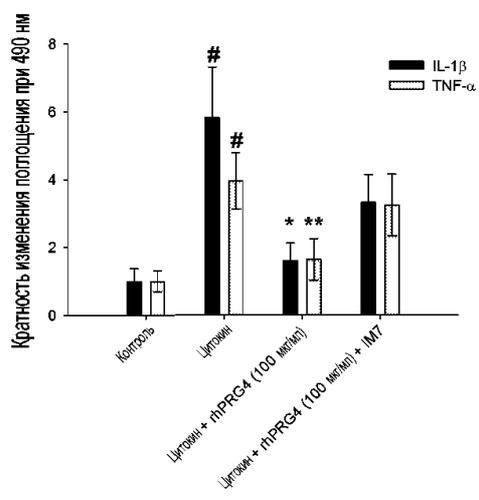
Prg4 ^{+/+} Синовиоциты



Фиг. 5А



Фиг. 5В



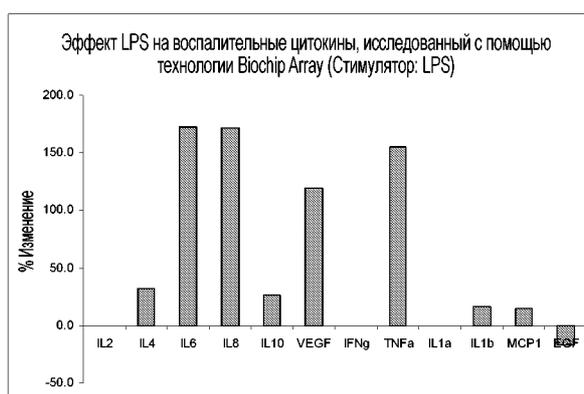
Фиг. 5С

TGCACCCACCCTCCCAAGGAGCCTTCACCCACCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCCTCC
 AAGGAGCCTGCACCCACCACCCCAAGAAGCCTGCCCACTACCCCAAGGAGCCTGCACCCA
 CCACTCCCAAGGAACCTGCACCCACCACCACCAAGAAGCCTGCACCCACCGCTCCCAAGAGCC
 TGCCCAACTACCCCAAGGAGACTGCACCCACCACCCCAAGAAGCTCACGCCACCACCCCC
 GAGAAGCTCGCACCCACCACCCCTGAGAAGCCCGCACCCACCACCCCTGAGGAGCTCGCACCCA
 CCACCCCTGAGGAGCCACACCCACCACCCCTGAGGAGCCTGCTCCACCACTCCCAAGGCAGC
 GGCTCCCAACACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCT
 AAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCA
 CTACCCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCAAGGAGCTGCACCCAC
 CACCACCAAGGAGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCT
 GCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTA
 AGGGAGCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAAC
 GGAGCTTGACCCACCACCACCAAGGGGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCTGCTCCAACCT
 ACACCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCAAGGAGCCTGCACCCACTACCCCAAGAAGCCTG
 CTCCAACCTACTCCTGAGACACTCCTCCAACCCTTCAGAGGTCTCTACTCCAACCTACCACCAA
 GGAGCCTACCCTATCCACAAAAGCCCTGATGAATCAACTCCTGAGCTTTCTGCAGAACCCACA
 CCAAAAGCTCTTGAAAACAGTCCCAAGGAACCTGGTGTACTACAACCTAAGACTCTGCAGCGA
 CTAAACTGAAATGACTACAACAGCTAAAGACAAGACAACAGAAAGAGACTTACGTACTACCC
 TGAAACTACAACCTGCTGCACCTAAGATGACAAAAGAGACAGCAACTACAACAGAAAAAATACC
 GAATCCAAAATAACAGCTACAACCACACAAGTAACATCTACCACAACCTCAAGATACCACACCAT
 TCAAAATTACTACTCTTAAAACAACCTACTCTTGACCCCAAAGTAACTACAACAAAAAAGACAAT
 TACTACCCTGAGATTATGAACAAAACCTGAAGAAAACAGCTAAACCAAAAGACAGAGCTACTAAT
 TCTAAAGCGACAACCTCTAAACCTCAAAAGCCAAACAAAGCACCACAAAAAACCCTTCTACCA
 AAAAGCCAAAAAATGCTTAGAGTGAGAAAACCAAGACGACACCAACTCCCGCAAGATGAC
 ATCAACAATGCCAGAATTGAACCCCTACCTCAAGAATAGCAGAAGCCATGCTCCAACCCACCACC
 AGACCTAACCAACTCCAACCTCCAACCTAGTTGAAGTAAATCCAAGAGTGAAGATGCAGGTG
 GTGCTGAAGGAGAAACACCTCATATGCTTCTCAGGCCCATGTTTCAATGCTTGAAGTACTCC
 CGACATGGATTACTTACCAGAGTACCCAAATCAAGGCATTTATCATCAATCCCATGCTTTCCGAT
 GAGACCAATATATGCAATGGTAAGCCAGTAGATGGACTGACTACTTTGCGCAATGGGACATTAG
 TTGCATTCGGAGGTCATTTCTGGATGCTAAGTCCATTGAGTCCACCATTCTCCAGCTCGCAG
 AATTACTGAAGTTTGGGGTATTCCTTCCCCATGATACTGTTTTTACTAGGTGCAACTGTGAA
 GGAAAACTTTCTTCTTAAGGATTTCTCAGTACTGGCGTTTTACCAATGATATAAAAAGATGCAG
 GGTACCCCAAACCAATTTTCAAAGGATTTGGAGGACTAAGTGGACAATAGTGGCAGCGCTTTC
 AACAGCTAAATATAAGAACTGGCCCTGAATCTGTGATTTTTTCAAGAGAGGTGGCAGCATTGAG
 CAGTATATTTATAAACAGGAACCTGTACAGAAGTGCCCTGGAGAAGGCTGCTCTAAATATAC
 CAGTGTATGGAGAAATGACACAGGTTAGGAGAGCTGCTTTGAACTGCTATAGGACCTTCTCA
 AACACACACCATCAGAATTCATATTCACCTGCCAGACTGGCTTATCAAGACAAAGGTGCTCCT
 CATAATGAAGTTAAAGTGAGTATACTGTGGAGAGGACTTCCAATGTGGTTACCTCAGCTATAT
 CACTGCCAACATCAGAAAACCTGACGGCTATGATTACTATGCCTTTCTAAAAGATCAATACTA
 TAACATGTATGCTAGTAGAACAGCAAGAGCAATTACTACTCGTCTGGGAGACCTTATCC
 AAAGTCTGGTACAACCTGCTTAGACTGATGAGCAAAGGAGGAGTCAACTAATGAAGAAATGAA
 TAATAAATTTTGACACTGAAAAACATTTTATTAATAAAGAAATTTGACATGAGTATACCAGTTT
 ATATATAAAAAATGTTTTAAACTTGACAATCATTACACTAAAACAGATTTGATAATCTTATCCA
 CAGTTGTTATGTTTACAGACCATTTAATTAATATTTCTCTGTTTTATCTCTCTCCCTCCC
 ATTGCATGGCTCACACCTGTAAGAAAAAAGAAATCAAATGAATATATCTTTAAGAATCAA
 AACTAGTGTATTCACTTACCCTAGTTCATTTAAAAAATATCTAGGCATTGTGGATATAAACT
 GTTGGGTATTCTACAACCTCAATGGAAATTTATACAAGCAGATTAATCCCTCTTTTTGTGACAC
 AAGTACAATCTAAAAGTTATATTGAAAAACATGGAATATTAATAATTTTACACTTTTACTAGCT
 AAAACATAATCACAAGCTTTATCGTGTGTATAAAAAAATTAACAATAAATGGCAATAGGTA
 GAGATACAACAAATGAATATAACACTATAACACTTCATATTTTCCAATCTTAATTTGGATTTA
 AGGAAGAAATCAATAAATAAATAAATAAGCACAATTTATATATATCTAAGGTATACAAATC
 TGTCTACATGAAGTTTACAGATTGGTAAATATCCTGCTCAACATGTAATTTTAAATAAAAC
 TTTGGAACATTAATAAATAAATTTGGAGGCTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

Фиг. 7

	Солевой раствор	LPS	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	1.06	1.4	32.1
IL6	11	30	172.7
IL8	206	590	171.8
IL10	0.36	0.46	26.3
VEGF	21	46	119.0
IFNg	0.3	0.3	0.0
TNFa	126	327	155.5
IL1a	0.5	0.5	0.0
IL1b	1.46	1.7	16.4
MCP1	79	91	15.2
EGF	4.1	3.4	-17.1

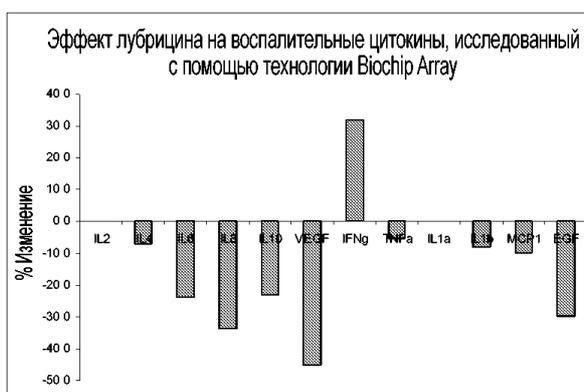
Фиг. 8А



Фиг. 8В

	Солевой раствор	Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	0.99	0.92	-7.1
IL6	69	66	-23.6
IL8	392	260	-33.7
IL10	2.76	2.14	-23.0
VEGF	12.69	6.95	-45.2
IFNg	0.22	0.29	31.8
TNFa	9.5	9	-5.3
IL1a	0.25	0.25	0.0
IL1b	7.53	6.92	-8.1
MCP1	223	201	-9.9
EGF	1.75	1.23	-29.7

Фиг. 9А



Фиг. 9В

	LPS	LPS/ Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	1.4	1.2	-14.3
IL6	30	29	-3.3
IL8	570	504	-11.6
IL10	0.48	0.32	-33.3
VEGF	48	34	-29.2
IFNγ	0.52	0.52	0.0
TNFα	327	301	-8.0
IL1a	0.62	0.62	0.0
IL1b	1.62	1.21	-25.3
MCP1	91	68	-25.3
EGF	4.1	2	-51.2

Фиг. 10А



Фиг. 10В

	TNF α	TNF α / Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	0.98	0.98	2.1
IL6	95	98	-28.4
IL8	400	235	-41.3
IL10	10	9	-10.0
VEGF	65	41	-36.9
IFNγ	1.4	0	-100.0
TNFα	883	34	-96.1
IL1a	0.33	0.41	24.2
IL1b	34	18	-47.1
MCP1	280	280	0.0
EGF	19	11	-42.1

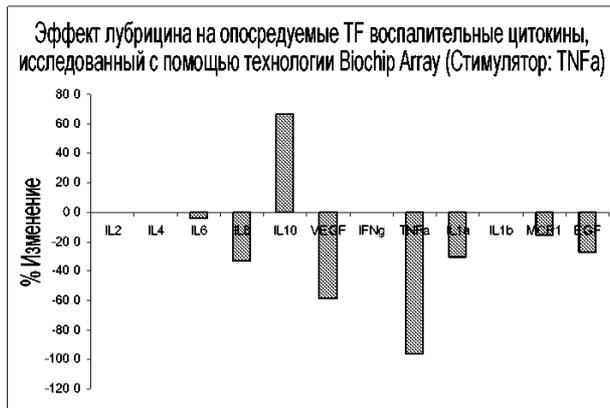
Фиг. 11А



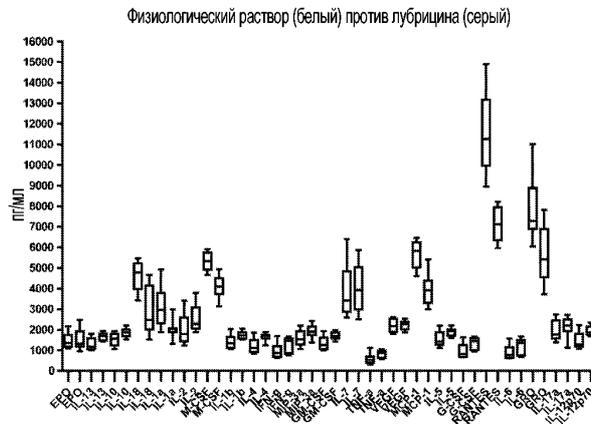
Фиг. 11В

	TF	TF/ Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	0.82	0.82	0.0
IL6	71	68	-4.2
IL8	350	233	-33.4
IL10	1.28	2.1	66.7
VEGF	29	12	-58.6
IFNg	0.3	0.3	0.0
TNFa	8.32	0.3	-96.4
IL1a	0.33	0.23	-30.3
IL1b	7.16	7.15	-0.4
MCP1	199	166	-16.6
EGF	2.74	1.99	-27.4

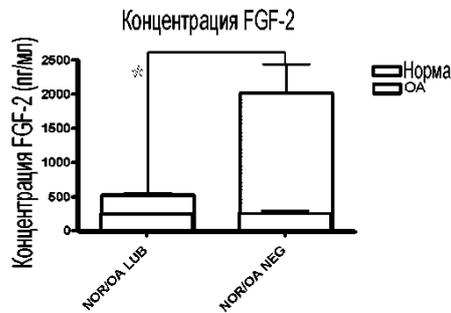
Фиг. 12А



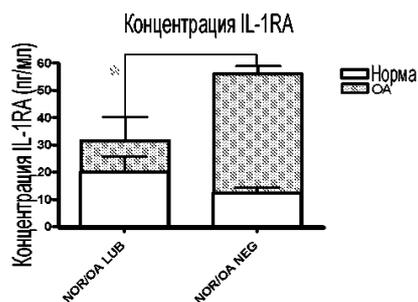
Фиг. 12В



Фиг. 13

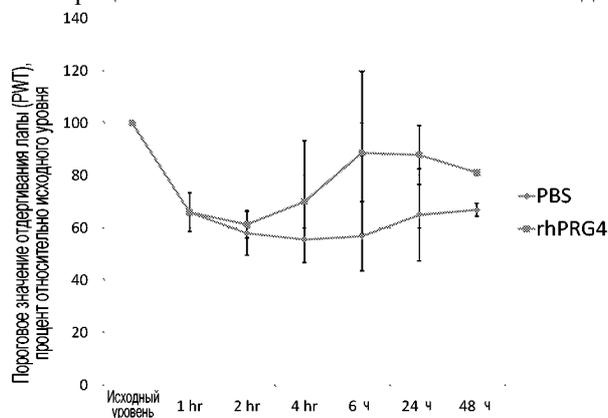


Фиг. 14А



Фиг. 14В

Влияние внутрисуставного введения рекомбинантного протеогликана 4 человека (rhPRG4) на индуцируемое кристаллом урата мононатрия (MSU) изменение давления отдергивания лапы (PWT) у самцов крыс Lewis. Самцам крыс Lewis (возраст 10 недель; N=4) инъецировали суспензию MSU (50 мкл; 5 мг/мл; Invitrogen, California) в их коленные суставы. Через 1 ч после инъекции MSU в коленные суставы крыс лечили 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS; n=4) или rhPRG4 (50 мкл; 2 мг/мл) (n=2). Давление отдергивание лапы измеряли с использованием электронного устройства фон Фрея, и данные представлены в качестве процентного изменения относительно исходных величин.



Фиг. 15

