(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190310 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.01

(22) Дата подачи заявки
2019.09.14

(51) Int. Cl. ***A61K 38/16*** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) БЕЛОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **201821009667**
(32) **2018.09.16**
(33) **IN**
(86) **PCT/IB2019/057757**
(87) **WO 2020/074984 2020.04.16**

(71) Заявитель:
ЮНИКЕМ ЛАБОРАТОРИЗ ЛТД (IN)

(72) Изобретатель:
Сате Дхананджай, Кумар Судип, Катдаре Мамата (IN)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к лектину для применения в лечении, уменьшении прогрессирования и излечении воспаления у субъекта, нуждающегося в этом. Также описаны фармацевтические композиции, содержащие указанный лектин. Лектин может включать аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

202190310 A1

202190310 A1

БЕЛОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки Индии № 201821009667, поданной 16 сентября 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к применению белков-лектинов для предотвращения, лечения и излечения воспалений, включая воспалительные заболевания.

Уровень техники

Воспаление способствует защите поврежденной ткани от дальнейшего инфицирования путем запуска многофакторной сети химических сигналов, которые запускают процесс заживления. Это включает активацию и миграцию важных клеток крови (нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов) к месту повреждения. Клетки (макрофаги, тучные клетки, эндотелиальные клетки и шванновские клетки) секретируют цитокины и специфические факторы роста, необходимые для регенерации нервов, и в конечном итоге приводят к восстановлению нормального микроокружения.

Воспаление, связанное с заживлением ран (нормальное воспаление), обычно проходит самостоятельно; однако нарушение регуляции любого из взаимозависимых факторов может привести к нарушениям и, в конечном итоге, к патогенезу, характеризующемуся острым или хроническим воспалением. Хроническое воспаление - это длительное воспаление, которое может длиться несколько месяцев и даже лет, в то время как острое воспаление начинается быстро и становится тяжелым за короткий промежуток времени. Хронические воспаления включают псориаз / псориатический артрит, ревматоидный артрит (РА), активный гепатит, астму и воспалительные заболевания кишечника, которые необходимо умело вести и вовремя лечить. Повреждения, вызванные хроническими воспалениями, необратимы и очень болезненны.

В настоящее время лекарства, применяемые для лечения некоторых воспалительных заболеваний, различаются в зависимости от типа заболевания. Обычно применяемые лекарства включают :

Анальгетики помогают уменьшить боль, но не влияют на воспаление. Примеры включают ацетаминофен (тайленол и другие), трамадол (ультрам, ультрацет и другие) и наркотики, содержащие оксикодон (перкосет, оксиконтин и другие) или гидрокодон (норко, викопрофен и другие). Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) уменьшают и боль, и воспаление. НПВП включают ибупрофен (адвил, мотрин IB и другие) и напроксен натрия (алив). Некоторые виды снимающих раздражение кремов и мазей содержат ментол или капсаицин. Болезнь-модифицирующие антиревматические препараты (БМАРП) часто применяются для лечения ревматоидного артрита. БМАРП замедляют или останавливают атаку иммунной системы на суставы. Примеры включают метотрексат (трексал) и гидроксихлорохин (плаквенил). Новая подкатегория БМАРП, известная как «ингибиторы JAK», блокирует пути киназы Янус, или JAK, которые участвуют в иммунном ответе организма. Тофацитиниб принадлежит к этому классу. В отличие от биопрепаратов, его можно принимать перорально. Обычно применяемые вместе с БМАРП модификаторы биологических реакций представляют собой генно-инженерные препараты, нацеленные на различные белковые молекулы, участвующие в иммунном ответе. Это ингибиторы B/T-клеток, селективные модуляторы костимуляции. Примеры включают этанерцепт (энбрел), цертолизумаб (симзия), ритуксимаб (ритуксан) и инфликсимаб (ремикейд). Кортикостероиды, такие как преднизон и кортизон, уменьшают воспаление и подавляют иммунную систему.

Медикаментозное лечение можно дополнять терапией (физиотерапией, воздействием тепла и холода), снижением веса, тракционным вытяжением, упражнениями, чрескожной электронейростимуляцией (ЧЭНС) и хирургическим вмешательством. Однако, каждое из упомянутых выше лекарств имеет собственные побочные эффекты. Таким образом, одним из вариантов являются биопрепараты. Эти препараты являются разновидностью БМАРП. Биопрепараты могут действовать быстрее, чем традиционные БМАРП, и вводятся путем инъекции или инфузии. Поскольку они нацелены на определенные этапы воспалительного процесса, они не устраняют весь иммунный ответ, как это делают некоторые другие средства лечения воспалительных заболеваний. У многих людей с воспалительными заболеваниями биопрепарат может замедлить, изменить или остановить заболевание, даже если другие средства лечения не помогли в достаточной мере. Сегодня существует очень немного

одобренных биопрепаратов для лечения воспалительных заболеваний. Они очень дороги и труднодоступны из-за ограниченного производства и высокого спроса. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в обеспечении варианта лечения воспалительных заболеваний, в котором этот вариант очень специфичен в отношении своего воздействия, дешев и эффективно удовлетворяет спрос рынка.

Задача изобретения

Таким образом, задачей настоящего изобретения является создание высокоспецифичного и эффективного биопрепарата для лечения воспалительных заболеваний.

Еще одна задача изобретения - обеспечит экономичный и эффективный способ лечения воспалительных заболеваний.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение рекомбинантного белка для лечения воспалительных заболеваний.

Еще одна задача настоящего изобретения - обеспечить способ лечения воспалительных заболеваний с применением рекомбинантного белка.

Еще одна задача изобретения - обеспечить способ излечения или уменьшения эффекта воспалительных заболеваний у субъекта, страдающего этими заболеваниями.

Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен белок-лектин для применения в лечении или предотвращении воспаления у субъекта.

Лектины - это высокоспецифичные белки, связывающие углеводы, макромолекулы, которые являются высокоспецифичными для фрагментов сахара других молекул. Лектины выполняют распознавание на клеточном и молекулярном уровне и играют многочисленные роли в феноменах биологического распознавания с участием клеток, углеводов и белков. Это двухвалентные или поливалентные углевод-связывающие белки, которые связывают и преципитируют гликопротеины и агглютинируют красные кровяные тельца. Лектины, обнаруживаемые у животных, чаще всего помогают в клеточных взаимодействиях, в то время

как лектины растений известны своими функциями отражения потенциальных хищников или патогенов.

Очищенные лектины важны в клинических условиях, потому что они применяются для определения группы крови. Некоторые гликолипиды и гликопротеины в красных кровяных тельцах человека можно идентифицировать посредством лектинов. Многие лектины применяются в качестве биомаркеров, служащих индикаторами раннего обнаружения злокачественного роста, или в качестве индукторов аутофагии, в то время как другие лектины также демонстрируют способность подавлять раковый рост по механизму апоптоза. Из-за нерегулируемой клеточной пролиферации некоторые углеводные фрагменты экспрессируются как антиген на раковых клетках. Лектины используются в качестве средства доставки препаратов при лечении рака, поскольку они специфически связываются со злокачественными опухолями. Кроме того, поскольку лектины также модулируют пути, связанные с раком, они обладают потенциалом в качестве агентов диагностики и терапии рака.

Существует несколько антигенов, с которыми связываются лектины и которые были охарактеризованы на поверхности раковых клеток; большинство антигенов специфичны для определенного типа рака, и связывание лектина с этими антигенами может приводить к ингибированию ракового роста за счет индукции апоптоза в раковых клетках. В настоящее время большинство имеющихся в продаже лектинов получают из растений и других эукариот.

Лектин *Sclerotium rolfsii*, СРЛ (SRL) - это лектин, который был выделен из склероций почвенного фитопатогенного гриба *S. rolfsii*. Было показано, что СРЛ (SRL) связывается с раком толстой кишки, раком яичников и лейкемическими клетками человека.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что лектины могут применяться при лечении воспаления.

Согласно второму аспекту изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок-лектин и фармацевтически приемлемые разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно третьему аспекту изобретения предложен способ лечения или предотвращения воспаления у субъекта, включающий введение субъекту лектина или фармацевтической композиции согласно второму аспекту изобретения.

Лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления лектин содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления лектин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4. Лектин может быть рекомбинантным.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительных заболеваний с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Далее, настоящее изобретение относится к белку-лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белку-лектину, имеющему по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1, для применения при лечении воспалительных заболеваний у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения начала или прогрессирования воспалительных заболеваний у субъекта с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Далее, настоящее изобретение относится к способу излечения или уменьшения эффекта воспалительных заболеваний у субъекта с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Далее, настоящее изобретение относится к белку-лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или белку-лектину, имеющему по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1, для применения в излечении, предотвращении прогрессирования или ослаблении эффекта воспалительных заболеваний у субъекта.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения артрита с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Далее, настоящее изобретение относится к белку-лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белку-лектину, имеющему по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1, для применения при лечении артрита у субъекта.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения начала или прогрессирования артрита у субъекта с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Далее, настоящее изобретение относится к способу излечения или уменьшения эффекта артрита у субъекта с применением белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к белку-лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или белку-лектину, имеющему по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1, для применения в излечении, предотвращении прогрессирования или уменьшении эффекта артрита у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения воспалительных заболеваний. Способ включает введение белка-лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белка-лектина, имеющего по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1. Белок-лектин можно вводить в количестве от около 1 мг до 50 мг/кг веса тела субъекта. Белок-лектин можно вводить как есть или в фармацевтически приемлемой форме.

Белок-лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или белок-лектин, имеющий по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1, можно вводить субъекту путем инъекции раствора или суспензии внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, внутрикожно, путем депо-инъекции, интратекально, трансдермально, сублингвально или пероральными, местными или ингаляционными способами.

Термин «лектин» В настоящем документе относится к белку, связывающему углеводы.

Термин «белок» В настоящем документе относится к полимеру из аминокислотных остатков.

Термин «аминокислота» В настоящем документе относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые имеют функцию, аналогичную природным аминокислотам. Природными аминокислотами являются

те, которые кодируются генетическим кодом и включают протеиногенные аминокислоты (т.е. аминокислоты, которые биосинтетически включаются в белки во время трансляции в клетках). Природные аминокислоты также включают аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. Синтетические аминокислоты включают неканонические аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин. Обычно синтетические аминокислоты являются непротеиногенными аминокислотами.

Очевидно, что аминокислоты могут быть сгруппированы по различным биохимическим свойствам. Примеры включают: полярные аминокислоты, неполярные аминокислоты, кислые аминокислоты и щелочные аминокислоты. В одном варианте осуществления аминокислота, применяемая для аминокислотной модификации, представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из, без ограничения перечисленными, полярной, неполярной, кислой, щелочной, селеноцистеина, пирролизина и неканонической.

Термины «гомология» или «гомологичный» В настоящем документе относятся к двум или более объектам, к которым они относятся, которые имеют, по меньшей мере, частичную идентичность в данной области или части. Области, участки или домены гомологии или идентичности относятся к части двух или более объектов, к которым они относятся, которые имеют гомологию или являются одинаковыми. Таким образом, если две последовательности идентичны в одной или большем количестве участков последовательностей, они идентичны в этих участках. Существенная гомология относится к молекуле, которая является структурно или функционально неизмененной, так что она имеет или предположительно имеет по меньшей мере частичную структуру или функцию одной или более структур или функций (например, биологической функции или активности) референсной молекулы, или релевантный / соответствующий участок или часть референсной молекулы, с которой она имеет гомологию.

В одном варианте осуществления процент «гомологии» между двумя последовательностями определяется с использованием алгоритма BLASTP (Средство поиска основного локального выравнивания, медленное сравнение с целью поиска всех сходных последовательностей) с параметрами по умолчанию (Altschul et al. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25 (17): 3389-402). В частности, к алгоритму BLAST можно получить доступ в интернете по URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. В альтернативном варианте осуществления для глобального выравнивания последовательностей процент гомологии между двумя последовательностями определяется с использованием алгоритма открытого комплекта

программ европейской молекулярной биологии (EMBOSS) Needle с использованием параметров по умолчанию. В частности, к алгоритму EMBOSS Needle можно получить доступ в интернете по URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Если не указано иное, термин «гомология» применяется взаимозаменяемо с термином «идентичность последовательности» в настоящей спецификации.

Воспаление обычно проявляется в виде припухших красных горячих пятен на теле. Однако воспаление может протекать без каких-либо очевидных симптомов. Воспаление можно обнаружить путем измерения концентрации высокочувствительного С-реактивного белка и подсчета количества лейкоцитов. Эти параметры можно измерить с помощью анализа крови.

С-реактивный белок, СРБ (CRP), белок крови, является одним из лучших индикаторов воспаления, поскольку уровень СРБ повышается по мере усиления воспаления. В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что у субъекта в крови концентрация С-реактивного белка по меньшей мере 1,0 мг/л, по меньшей мере 3,0 мг/л или по меньшей мере 10,0 мг/л.

Высокий уровень лейкоцитов может указывать на инфекцию, стресс, воспаление, травму, аллергию или определенные заболевания.

Нормальный диапазон количества лейкоцитов для взрослых обычно составляет 4000-10500 клеток на мл крови. Количество выше 10500 считается высоким. В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что у субъекта количество лейкоцитов составляет по меньшей мере 10500 клеток на мл.

Инсулин - это гормон, вырабатываемый и запасаемый в поджелудочной железе, который помогает регулировать уровень глюкозы в крови. Инсулинорезистентность - это снижение способности реагировать на воздействия инсулина. В результате организм вырабатывает дополнительное количество инсулина, что усиливает воспалительные процессы в организме. Клинический диапазон составляет 2,6-24,9 мкМЕ/мл; оптимальный диапазон составляет 1,0–5,0 мкМЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что субъект имеет уровень инсулина по меньшей мере 5,0 мкМЕ/мл или по меньшей мере 24,9 мкМЕ/мл.

Гемоглобин A1C (HbA1c) обеспечивает среднее количество глюкозы в крови или сахара в крови за предыдущие 3 месяца (срок жизни красных кровяных телец составляет 3 месяца).

Гемоглобин A1c (или гликированный гемоглобин) образуется в крови, когда глюкоза присоединяется к гемоглобину, белку в красных кровяных тельцах, переносящему кислород. Чем выше уровень глюкозы в крови, тем больше гликированного гемоглобина образуется. Сахар в крови, будучи хронически повышенным, вступает в реакцию с ферментами и другими белковыми молекулами с образованием конечных продуктов гликирования, КПГ (AGEs). КПГ вызывают сильное воспаление и повреждение тканей по всему телу. В результате возникают неврологические и сердечно-сосудистые осложнения, типичные для диабета. Клинический диапазон составляет 4,8% -5,6%; оптимальный диапазон составляет 4,5% -5,2%. Уровни HbA1c обычно измеряются как процент гликированного гемоглобина по сравнению с негликированным гемоглобином или как безразмерная единица.

В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что субъект имеет уровень HbA1c по меньшей мере 5,2% или по меньшей мере 5,6%.

Ферритин - это белок клеток крови, который хранит железо. Низкий уровень ферритина указывает на дефицит железа, который вызывает анемию, уменьшение количества красных кровяных телец. Как и СРБ (CRP), ферритин является реактантом острой фазы. Это делает ферритиновый тест полезным для выявления процесса хронического заболевания. Повышенный уровень ферритина может указывать на воспаление. Клинический диапазон: 30-400 нг/мл; оптимальный диапазон для женщин (10–300 нг/мл) и для мужчин (23–336 нг/мл).

В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что субъект имеет уровень ферритина по меньшей мере 200 нг/мл, по меньшей мере 300 нг/мл или по меньшей мере 336 нг/мл.

Распределение эритроцитов по объему (Red Cell Distribution Width, RDW) - прекрасный тест для обнаружения воспаления в организме. RDW является «надежным прогностическим параметром» риска смерти от всех причин и нарушения кровотока. RDW отражает общее воспаление и окислительный стресс. RDW - это выражение изменения размера эритроцитов, составляющих общую популяцию эритроцитов у человека. Размер кровеносного сосуда во многом зависит от созревания клеток крови, и это зависит от метилирующих агентов, таких как фолат и B12. Клинический диапазон - 12,3-15,4%; оптимальный диапазон - 11,6-15%.

В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что субъект имеет значение RDW по меньшей мере 15% или по меньшей мере 15,1%.

Ревматоидный фактор - это антитело, которое действует против компонента крови гамма-глобулина. Клинический диапазон составляет 20 МЕ/мл или выше; оптимальный диапазон составляет 0-20 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления термин «воспаление» означает, что субъект имеет уровень ревматоидного фактора по меньшей мере 20 МЕ/мл.

И Т-клетки, и макрофаги секретируют интерлейкин 6 (IL-6) как часть воспалительного ответа, поэтому повышенный уровень IL-6 у субъекта может указывать на системное воспаление.

Краткое описание сопутствующих последовательностей

- SEQ ID NO: 1: представляет собой аминокислотную последовательность нативного лектина *S. rolfsii*.
- SEQ ID NO: 2: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина S. *rolfsii* (упомянутой как Rec-2 в WO 2010/095143).
- SEQ ID NO: 3: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (упомянутой как Rec-3 в WO 2010/095143).
- SEQ ID NO: 4: представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (упомянутой в WO 2014/203261).

SEQ ID NO: 1 имеет следующую последовательность:

TYKIT VRVYQ TNPNA FFHPV EKTVW KYANG GTWTI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF HADNG ESFTA TFGVH NYKRW CDIVT NLAAD ETGMV INQQY YSQKN REEAR ERQLS NYEVK NAKGR NFEIV YTEAE GNDLH ANLII G

SEQ ID NO: 2 имеет следующую последовательность:

TYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTVW KYANG GTWTI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF HADNG ESFTA TFGVH NYKRW CDIVT NLAAD ETGMV INQQY YSQKN REEAR ERQLS NYQVK NAKGR NFQIV YTEAE GNDLH ANLII G

SEQ ID NO: 3 имеет следующую последовательность:

VYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTVW KYANG GTWSI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF HADNG ESFTA TFGVH NYKRW CDIVT NLAAD ETGMV INQQY YSQKN REEAR ERQLS NYQVK NAKGR NFQIV YTEAE GNDLH ANLII G

SEQ ID NO: 4 имеет следующую последовательность:

VYKIT VRVYQ TNPDA FFHPV EKTVW KYADG GTWSI TDDQH VLTMG GSGTS GTLRF HADNG ESFTA TFGVH DYKRW CDIVT DLAAD ETGMV INQEY YSEKD REEAR ERQNS NYEVK DAKGR NFEIV YTEAE GNDLH ADLII G

Различия в последовательности SEQ ID NO: 2-4 по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 подчеркнуты.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложен лектин для применения в лечении или предотвращении воспаления у субъекта, нуждающегося в этом.

Лектин может быть природным. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лектин получен из группы, состоящей из, без ограничения перечисленными грибов и растений. В некоторых вариантах осуществления лектин получен из почвенного фитопатогенного гриба, такого как *S. rolfsii*. Под «полученным из» следует понимать, что лектин может быть выделен из его нативной среды, или что лектин содержит аминокислотную последовательность, которая идентична или подобна нативной последовательности. Лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с нативной последовательностью. Лектин может быть выделен из *S. rolfsii*.

Лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с SEQ ID NO: 2, 3 или 4.

SEQ ID NO: 2 имеет 98% гомологию с SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 3 имеет 96% гомологию с SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 4 имеет 91% гомологию с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления лектин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Лектин может быть рекомбинантным, или он может быть синтезирован *de novo*. В настоящем описании термин «рекомбинантный» означает, что ген лектина переносится в клетку-хозяин (такую как бактерии или дрожжи), а затем ген экспрессируется с образованием лектина. Способы получения рекомбинантных белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, может быть предусмотрена рекомбинантная молекула ДНК, такая как плазмида или вирусный вектор, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лектин. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с промотором, который способен контролировать экспрессию лектина в подходящей клетке-хозяине. Молекула рекомбинантной ДНК может быть помещена в подходящую клетку-хозяин с применением способов, известных в данной области техники, например, путем трансформации. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки (например, *E. coli*) и как низшие эукариотические клетки (например, дрожжевые клетки), так и высшие эукариотические клетки. Затем клетку-хозяин можно культивировать в подходящих условиях, посредством чего рекомбинантный лектин экспрессируется. Рекомбинантный лектин может быть, таким образом, получен путем выделения в качестве продукта экспрессии из клетки-хозяина. Рекомбинантные белки можно очищать обычными способами, известными в данной области техники, обычно общепринятыми хроматографическими способами.

Лектин может обладать по меньшей мере одним противовоспалительным действием.

В некоторых вариантах осуществления лектин способен ингибировать или снижать секрецию воспалительного цитокина.

Как известно в данной области, цитокины представляют собой небольшие белки, участвующие в передаче сигналов клетки. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли, ФНО (TNF). В настоящем документе интерлейкин (IL) включает IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1ß, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IL-23, IL-20, и IL-15.

Лектин может быть способен ингибировать или снижать секрецию одного или более воспалительных цитокинов, выбранных из IL-8, IL-6, TNF-α, IL-1-β, IFN-γ и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, ГМ-КСФ (GM-CSF).

Способность лектина ингибировать или снижать секрецию воспалительных цитокинов может быть определена с применением стандартных методик, включая способы, описанные в настоящем документе. Например, уровень воспалительного цитокина, секретируемого после воспалительного стимула (например, IFN-γ или липополисахарида, ЛПС (LPS)) в присутствии лектина, может быть определен и сравнен с уровнем цитокина, секретируемого после воспалительного стимула в отсутствие лектина. Уровни цитокинов в образцах, таких как супернатанты клеточных культур (для исследований *in vitro*) или образцы сыворотки (для исследований *in vivo*), могут быть определены с применением стандартных методов, таких как иммуноферментный анализ, ИФА (ELISA).

В некоторых вариантах осуществления лектин способен снижать секрецию воспалительного цитокина на 5-50%, 10-40%, 15-35% или 20-30%.

В некоторых вариантах осуществления лектин способен снижать уровень С-реактивного белка, СРБ (CRP) в крови. Уровень CRP в крови можно определить путем применения стандартных методик, таких как описанные здесь. Например, лектин может снижать уровень СРБ (CRP) в крови по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5% или по меньшей мере на 10% на 10 мг/кг лектина, введенного субъекту, по сравнению с контрольным субъектом, которому лектин не вводился.

В некоторых вариантах осуществления лектин способен стимулировать (т.е. повышать) активность щелочной фосфатазы, ЩФ (ALP) и / или уровни коллагена. Уровни ЩФ (ALP), например, в клеточных лизатах, можно определить известными анализами, такими как анализ п-нитрофенилфосфата, ПНФФ (PNPP). Уровни коллагена, например, в клеточных лизатах, также можно определить путем применения известных анализов, таких как анализ на основе красителя Sircoll. Лектин может повышать уровень активности ЩФ (ALP) на 5-50% или 10-40% по сравнению с подходящим контролем, который не был обработан лектином. Лектин может повышать уровень коллагена на 2-50% или 3-40% по сравнению с подходящим контролем, который не был обработан лектином.

В настоящем документе термин «воспаление» относится к любому типу воспалительного иммунного ответа у субъекта. Воспаление может быть связано с хроническим воспалительным заболеванием, или может быть острым воспалением.

Хроническое воспаление - это длительное воспаление, которое может длиться несколько месяцев и даже лет, в то время как острое воспаление начинается быстро и становится тяжелым за короткий промежуток времени. Хронические воспаления включают псориаз / псориатический артрит, ревматоидный артрит (РА), активный гепатит, астму и воспалительные заболевания кишечника, которые необходимо умело вести и вовремя лечить. Повреждения, вызванные хроническими воспалениями, необратимы и очень болезненны.

Термины «хронические воспаления» и «хронические воспалительные заболевания» используются здесь взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется хроническое воспалительное заболевание. Преимущественно белок-лектин можно применять для лечения или предотвращения хронического воспалительного заболевания у субъекта.

Хроническое воспалительное заболевание может представлять собой псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит (РА), гепатит, астму, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона, колит или синдром раздраженного кишечника (СРК)), височный артериит, атопический дерматит, системную волчанку, рассеянный склероз или саркоидоз.

В некоторых вариантах осуществления хроническое воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, РА (RA).

Ревматоидный артрит можно измерить или диагностировать с применением следующих факторов.

Антинуклеарные антитела, АНА (ANA) - Обычно обнаруживаемые в крови людей с системной красной волчанкой, АНА (ANA) (аномальные антитела, направленные против ядер клеток) также могут указывать на присутствие полимиозита, склеродермии, синдрома Шегрена, смешанного заболевания соединительной ткани или ревматоидного артрита. Тесты для обнаружения конкретных подгрупп этих антител могут применяться для подтверждения диагноза конкретного заболевания или формы артрита.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если у субъекта имеются обнаруживаемые уровни антинуклеарного антитела.

Ревматоидный фактор, РФ (RF) - Предназначенный для обнаружения и измерения уровня антител, действующих против компонента крови гамма-глобулина, этот тест часто бывает положительным у людей с ревматоидным артритом. Уровень 20 МЕ/мл или выше считается показателем заболевания.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если у субъекта уровень ревматоидного фактора составляет по меньшей мере 20 МЕ/мл.

Анти-циклический цитруллинированный пептид, АЦЦП (анти-ЦЦП) - Также называемый антителами к цитруллинированному белку (ACPA), этот тест (как и тест на ревматоидный фактор) устанавливает наличие определенного аутоантитела, которое присутствует примерно у 60-80 процентов людей с РА. В то время как большинство пациентов с АЦЦП (анти-ЦЦП) также положительны на ревматоидный фактор, антитела РФ (RF) могут встречаться у пациентов со многими другими состояниями, включая инфекцию. АЦЦП (анти-ЦЦП) более специфичен для РА (RA) и становится предпочтительным тестом.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если субъект имеет обнаруживаемые уровни антител против цитруллинированного белка выше 20 единиц на миллилитр (ед/мл).

Мочевая кислота - Предназначенный для измерения уровня мочевой кислоты в крови, этот тест помогает диагностировать подагру, состояние, которое возникает, когда избыток мочевой кислоты кристаллизуется и образует отложения в суставах и других тканях, вызывая воспаление и сильную боль. Нормальные уровни мочевой кислоты составляют 2,4-6,0 мг/дл у женщин и 3,4-7,0 мг/дл у мужчин.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если у субъекта уровень мочевой кислоты составляет по меньшей мере 6,0 мг/дл или по меньшей мере 7,0 мг/дл.

HLA-типирование тканей - Этот тест, который определяет присутствие определенных генетических маркеров в крови, часто может подтвердить диагноз анкилозирующего спондилита (заболевание, включающее воспаление позвоночника и крестцово-подвздошного сустава) или реактивного артрита (заболевание, сопровождающееся воспалением уретры, глаз и суставов). Генетический маркер HLA-B27 почти всегда присутствует у людей с любым из этих заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если субъект имеет генетический маркер HLA-B27.

Скорость оседания эритроцитов - Также называемый СОЭ или «скорость оседания», этот тест измеряет, насколько быстро красные кровяные тельца слипаются, опадают и оседают (в виде осадка) на дне стеклянной пробирки в течение часа. Чем выше скорость оседания, тем сильнее воспаление. Эта скорость оседания измеряется расстоянием, на которое эритроциты опускаются по трубке за час. Нормальный диапазон составляет 0–29 мм/ч для женщин и 0–20 мм/ч для мужчин. Есть много состояний, которые могут вызвать повышение СОЭ, включая инфекцию или анемию.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если у субъекта скорость оседания эритроцитов составляет по меньшей мере 20 мм/ч или по меньшей мере 29 мм/ч.

С-реактивный белок - Этот тест, также называемый СРБ (CRP), представляет собой еще один анализ крови, который измеряет воспаление во всем организме. Он измеряет количество вещества, вырабатываемого печенью, которое увеличивается в присутствии воспаления.

В некоторых вариантах осуществления субъект считается имеющим ревматоидный артрит, если у субъекта в крови концентрация С-реактивного белка по меньшей мере 1,0 мг/л, по меньшей мере 3,0 мг/л или по меньшей мере 10,0 мг/л.

Серологическая диагностика Лайм-боррелиоза - Этот тест определяет иммунный ответ на инфекционный агент, вызывающий болезнь Лайма, и, таким образом, может применяться для подтверждения диагноза болезни.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется острое воспаление. Преимущественно белок-лектин можно применять для лечения или предотвращения острого воспаления у субъекта.

Острое воспаление может быть вызвано аллергической реакцией, химическим или радиационным воздействием, инфекцией или травмой. Инфекция может быть бактериальной, вирусной, грибковой или паразитарной.

Следует понимать, что термин «лечение» включает по существу излечение (т.е. устранение) воспаления или лежащего в основе хронического воспалительного заболевания, или уменьшение (либо постоянно, либо временно) симптомов, связанных с воспалением. Такие

симптомы могут включать припухлость, боль, зуд, жар, покраснение (например, кожи), потерю функции (например, суставов или конечностей) и затруднение дыхания.

Следует понимать, что термин «предотвращение» может включать предотвращение начала воспаления или предотвращение или замедление прогрессирования воспаления или лежащего в его основе хронического воспалительного заболевания.

Лечение или предотвращение может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества лектина. В некоторых вариантах осуществления лектин вводят в дозе от 0,1 до 1000 мг/кг, от 0,5 до 100 мг/кг или от 1 до 50 мг/кг. Специалист в данной области техники сможет определить количество лектина для введения в соответствии с природой состояния, подлежащего лечению, и субъекта.

Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок-лектин и фармацевтически приемлемые разбавитель или вспомогательное вещество. Примеры разбавителей и вспомогательных веществ включают стерилизованную воду, физиологический раствор и / или фармацевтически приемлемый буфер.

Далее, настоящее изобретение предлагает способ лечения или предотвращения воспаления у субъекта, причем способ включает введение субъекту лектина или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Введение лектина или композиции может осуществляться любым подходящим путем, включая, без ограничения перечисленным, инъекцию (включая внутривенную (болюс или инфузию), внутриартериальную, внутрибрюшинную, подкожную (болюс или инфузию), внутрижелудочковую, внутримышечную или субарахноидальную), пероральный прием (например, таблетка, гель, леденец или жидкость), ингаляция, местно, через слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, носа или прямой кишки), путем доставки в форме спрея, таблетки, трансдермального пластыря, подкожного имплантата или в форме суппозитория.

В некоторых вариантах осуществления лектин (такой как лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4) или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, вводится субъекту энтерально, парентерально или местно. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить в виде твердой дозированной формы (такой как таблетка или капсула), лиофилизированного порошка, жидкости (например, раствора или

суспензии), полутвердой или любой другой формы, известной специалисту в данной области техники. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить субъекту путем инъекции раствора или суспензии внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, или внутрикожно, путем депо-инъекции, или их можно вводить интратекально, трансдермально, сублингвально или перорально, местно или ингаляционно.

Субъект может быть млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В частности, субъектом может быть человек, страдающий или стремящийся предотвратить воспаление или воспалительное заболевание.

Описание чертежей и таблиц

Ниже изобретение будет описано посредством ссылки на следующие фигуры и таблицы, на которых:

Фиг. 1: Влияние рекомбинантного лектина на ингибирование воспалительных цитокинов в исследовании *in vivo* с применением мышиной модели ЛПС (LPS)-индуцированного высвобождения цитокинов;

Фиг. 2: Влияние рекомбинантного лектина на опухание лапы с применением крысиной модели адъювант-индуцированного артрита, АИА (AIA);

Фиг. 3: Влияние рекомбинантного лектина на разрушение костей с использованием крысиной модели адъювант-индуцированного артрита, АИА (AIA);

Фиг. 4: Влияние рекомбинантного лектина на ингибирование уровня СРБ (CRP) и IL-6 с применением крысиной модели адъювант-индуцированного артрита, АИА (AIA);

Таблица 1: Влияние рекомбинантного лектина на секрецию цитокинов в линии синовиальных клеток человека (SW982) через 24 часа;

Таблица 2. Влияние рекомбинантного лектина на секрецию цитокинов мышиными спленоцитами через 48 часов;

Таблица 3. Влияние SEQ ID NO: 2 на секрецию цитокинов в линии мышиных макрофагов (RAW264.7) через 24 часа; и

Таблица 4. Влияние SEQ ID NO: 2 на активность ЩФ (ALP) и уровни коллагена в линии клеток остеобластов (MG-63) через 5 дней.

Воспалительные заболевания - это заболевания, вызванные нарушением работы иммунной системы. Воспалительные заболевания могут быть хроническими воспалительными заболеваниями или острыми воспалительными заболеваниями. Воспалительные заболевания включают артрит, псориаз, височный артериит, дерматит, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), системную волчанку, гепатит, астму, аллергические реакции, саркоидоз и подобные заболевания, как их понимает специалист в данной области техники.

Ключевыми сигнальными путями, которые играют важную роль в патогенезе воспаления, являются MAPK/EGFR/Ras/Raf, каннабиноидный рецептор 2 (CNR2), IL-4/STAT, PI3K/AKT/FOXO3, TNF-α/JNK, NLRP3 и NLRP1, *PTPN22*, *PADI4*, *STAT4*, *TRAF1-C5* и *TNFAIP3*, MyD88, IRAKs и TRAF6.

Настоящее изобретение относится к лечению воспалительных заболеваний с использованием лектина, такого как лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4. Изобретение также относится к способу предотвращения начала или прогрессирования воспалительных заболеваний у субъекта с применением лектина, такого как лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4. Далее, оно относится к способу излечения или уменьшения эффекта воспалительных заболеваний у субъекта с применением лектина, такого как лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

Настоящее изобретение относится к способу лечения артрита у субъекта с применением лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов. Далее, изобретение относится к лектину, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или его гомологам, применяемому для лечения артрита у субъекта. Согласно настоящему изобретению также предложен способ предотвращения начала или прогрессирования артрита у субъекта с применением рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов. Далее, изобретение относится к способу излечения или уменьшения эффекта артрита у субъекта с применением рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов.

В более ранней патентной заявке заявителя 350/MUM/2009 описан рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, обладающий высокой специфичностью связывания с углеводным антигеном (Galβ1–3GalNAc-α-O-Ser/Thr). Лектины обычно известны

тем, что вызывают воспаление. Однако авторы настоящего изобретения, к своему удивлению, обнаружили, что лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4 является противовоспалительным. Подробное исследование подтвердило эффективность рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 в отношении артрита. Новизна и изобретательский уровень настоящего изобретения заключаются в применении лектина, такого как рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, для предотвращения, излечения или уменьшения распространения воспаления, такого как воспаление, вызывающее артрит.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, на модуляцию ключевых сигнальных путей, которые играют важную роль в патогенезе воспаления, оценивали в клеточных анализах. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, показал способность ингибирования сигнальных путей, которые являются ключевыми путями в патогенезе воспаления, связанного с артритом. Эти результаты, подробно описанные ниже, предполагают возможное эффективное действие лектинов, таких как рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при воспалении, связанном с артритом.

Исследования *in vitro* рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, продемонстрировали сильную противовоспалительную активность за счет ингибирования провоспалительных цитокинов и ингибирования сигнальных путей, которые играют ключевую роль в патогенезе воспаления. Он также стимулировал активность ЩФ (ALP) и уровни коллагена в клетках остеобластов человека, поддерживая их противовоспалительный потенциал.

Синовиальные фибробласты продуцируют чрезмерные уровни воспалительных цитокинов, которые разрушают хрящи и кости в воспаленном суставе, пораженном артритом. Линия синовиоцитов человека характеризуется экспрессией воспалительных цитокинов. Клеточные анализы *in vitro* на клеточных линиях синовиоцитов человека проводили с использованием рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 для оценки его влияния на секрецию воспалительных цитокинов, таких как интерлейкины, интерфероны, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ГМ-КСФ (GM-CSF), PI3Kδ/γ и ФНО-α (TNF-α) в ответ на стимуляцию IFN-γ. Также оценивалось влияние использования рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, в клеточном анализе индукции ЛПС (LPS) *in vitro* на иммунных клетках мышиных спленоцитах и в клеточном анализе стимуляции IFN-γ *in vitro* на линии мышиных макрофагов RAW264.7. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, значительно ингибировал секрецию воспалительных цитокинов. Секреция IL-8 и IL-6 ингибировалась на 10-30% и 20-50% соответственно в синовиальных клетках по сравнению со стимуляцией интерфероном гамма (IFN-γ) (таблица 1). Подобным образом, рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал секрецию ФНО-α (TNF-α) и IL-1-β на 15-35% и 20-32% соответственно в спленоцитах, стимулированных ЛПС (LPS) (таблица 2). Ингибирование секреции ФНО-α (TNF-α) в клеточной линии мышиных макрофагов (RAW264.7), стимулированной IFN-γ, составляло от 5 до 30% (таблица 3). Результаты продемонстрировали, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибирует ключевые воспалительные цитокины в линии синовиальных клеток, а также в иммунных клетках.

Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, оценивали на предмет его влияния на стимуляцию маркеров метаболизма костной ткани, таких как активность щелочной фосфатазы, ЩФ (ALP) и уровни коллагена в линии клеток остеобластов человека. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, стимулировал активность ЩФ (ALP) в остеобластах на 10-45% по сравнению с контролем. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, также стимулировал уровни коллагена на 3-50% по сравнению с контролем (таблица 4).

Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, также тестировали на предмет его влияния на ингибирование воспалительных цитокинов в исследовании *in vivo* с применением мышиной модели ЛПС (LPS)-индуцированного высвобождения цитокинов. Мыши получали только липополисахарид, ЛПС (LPS) (50 мкг / животное) и ЛПС (LPS) (50 мкг / животное) вместе с рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (от 5 до 50 мг/кг веса тела). Дозирование рекомбинантного лектина, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, осуществляли за 1 час до инъекции ЛПС (LPS). Нормальные контрольные животные получали трис-забуференный физиологический раствор (TBS) в дозе 5 мл/кг. Все дозы вводились внутрибрюшинно. Избыточная секреция ФНО-α (TNF-α) (675,7 ± 76,6 пг/мл) и IL-6 (3256,0 ±

203,1 пг/мл) наблюдалась в сыворотке крови при введении только ЛПС (LPS). Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, значительно ингибировал секрецию цитокинов (фиг. 1). В частности, рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал секрецию ФНО-α (TNF-α) до 30% (471,8 ± 48,3 пг/мл) при концентрации около 20 мг/кг веса тела соответственно. Подобным образом, секреция IL-6 подавлялась до 43% (1866,2 ± 139,3 пг/мл) при концентрации около 20 мг/кг веса тела. s

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, было дополнительно протестировано на крысиной модели адъювант-индуцированного артрита, АИА (AIA). Животным инъецировали рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, внутрибрюшинно в концентрации 20 мг/кг веса тела в течение 21 дня (с 8 по 28 день после инъекции адъюванта). Получение рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, значительно уменьшало толщину лапы и области лодыжки по сравнению с животными с адъювант-индуцированным артритом, получавшими носитель (фиг. 2). Оценка рентгенограммы голеностопного сустава у животных с адъювант-индуцированным артритом, получавших носитель, показала серьезное разрушение кости по сравнению с нормальными контрольными животными. Значительное уменьшение разрушения костей было очевидно у животных, получавших рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (фиг. 3). Группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель, показала значительное уменьшение угла сустава по сравнению с нормальным контролем. У животных, получавших около 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2, дозозависимо увеличивалась подвижность суставов с процентным улучшением до 34,2%, соответственно. Влияние оказалось дозозависимым, поскольку более низкие дозы рекомбинантного лектина показали меньшее улучшение подвижности суставов. Далее, получение рекомбинантного лектина показало снижение уровней сывороточной мочевой кислоты по сравнению с животными с адъювант-индуцированным артритом, получавшими носитель, до 22%. С-реактивный белок, СРБ (CRP) вырабатывается печенью и может быть обнаружен в крови. Обычно, как и цитокины, уровни СРБ (CRP) в крови также повышаются в ответ на воспаление. У животных с адъювант-индуцированным артритом, получавших носитель, наблюдались повышенные уровни СРБ (CRP) и IL-6 в сыворотке. Значительное снижение уровней СРБ (CRP) наблюдалось у

животных, получавших рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (фиг. 4). Настоящее изобретение демонстрирует, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, значительно снижает прогрессирование и тяжесть артрита дозозависимым образом на крысиной модели ПАФ (FCA)-индуцированного артрита. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ лечения воспалительных заболеваний с применением лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов. Оно может быть применено в способах лечения, предотвращения начала или прогрессирования или для излечения, уменьшения эффекта воспалительных заболеваний у субъекта.

Способ может включать введение лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов в диапазоне от около 1 мг до 50 мг/кг веса тела субъекта, при этом рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 вводят как таковой или в фармацевтически приемлемой форме.

Предпочтительный диапазон рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов, составляет около от 5 до 30 мг/кг веса тела субъекта. Наиболее предпочтительный диапазон рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов, составляет около от 5 до 20 мг/кг веса тела субъекта.

Противоартритный эффект рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID 2, составляет от по меньшей мере 10% до 100%.

Примеры

Следующие примеры приведены для демонстрации наилучшего режима выполнения изобретения. Примеры не ограничивают изобретение ни в каком отношении.

Пример 1:

Было проведено исследование для оценки влияния рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на секрецию воспалительных цитокинов (IL-8 и IL-6) в клеточной линии синовиоцитов человека (SW982). Рекомбинантный лектин показал ингибирование секреции воспалительных цитокинов из клеточной линии.

Клетки синовиоцитов человека (SW982) вначале культивировали в течение 24 часов, затем на бессывороточной среде в течение 6 часов с последующей обработкой клеток рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 в нецитотоксических концентрациях (1 нг/мл - 1000 нг/мл) с воспалительным стимулом (100 нг/мл IFN-γ) в течение еще 24 часов. Уровни цитокинов (IL-6 и IL-8) в супернатантах определяли с помощью ИФА (ELISA). Ингибиторное влияние рекомбинантного лектина на секрецию цитокинов рассчитывали следующим образом:

% ингибирования цитокинов = [(A-B)/A]*100

Где,

A = концентрация цитокина в контрольных клетках (только IFN-γ)

B = концентрация цитокина в обработанных клетках (рекомбинантный лектин + IFN-γ)

Было видно, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал секрецию IL-8 синовиальными клетками (SW982) в ответ на стимуляцию IFN-γ (11,2–27,9%) и ингибировал секрецию IL-6 синовиальными клетками (SW982) в ответ на стимуляцию IFN-γ (23,7% - 49,4%).

Пример 2:

Другое исследование было проведено для определения влияния рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на секрецию воспалительных цитокинов (ФНО-α (TNF-α) и IL-1-β) иммунными клетками (мышиными спленоцитами и мышиными макрофагами клеточной линии (RAW264.7)).

Выделяли спленоциты мышей C57BL/6 и обрабатывали рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 в нецитотоксических концентрациях (1 нг/мл - 1000 нг/мл) вместе с 25 нг/мл ЛПС (LPS) в течение 48 часов.

Клетки RAW264.7 культивировали в течение 24 часов, затем на бессывороточной среде еще 24 часа с последующей совместной обработкой клеток рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 в нецитотоксических концентрациях (1 нг/мл - 500 нг/мл) и воспалительным стимулом IFN-γ (100 нг/мл) в течение 24 часов. Уровни цитокинов (ФНО-α (TNF-α) и IL-1-β) в супернатантах определяли с помощью ИФА (ELISA).

Ингибиторное влияние рекомбинантного лектина на секрецию цитокинов рассчитывали следующим образом:

% ингибирования цитокинов = [(A-B)/A]*100

Где,

A = концентрация цитокина в контрольных клетках (только ЛПС (LPS) или IFN-γ)

B = концентрация цитокина в обработанных клетках (рекомбинантный лектин + ЛПС (LPS) или IFN-γ)

Было обнаружено, что в спленоцитах мышей рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, демонстрировал ингибирование секреции цитокинов спленоцитами в ответ на стимуляцию ЛПС (LPS) (ФНО-α (TNF-α) на 17,2-32,9% и IL-1- β на 23,5% - 30,4%).

В мышиных макрофагах (RAW264.7) рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал секрецию TNF-α макрофагами (RAW264.7) в ответ на стимуляцию LPS (6,1% - 26,5%).

Пример 3:

Другое исследование было проведено для определения эффекта рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на маркеры метаболизма костной ткани (ЩФ (ALP) и коллаген) в клеточной линии остеобластов человека (MG-63). Сначала клетки MG-63 культивировали в течение 24 часов, затем на бессывороточной среде еще 24 часа с последующей обработкой клеток рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, в нецитотоксических концентрациях (1 нг/мл - 1000 нг/мл) в течение 5 дней. Активность ЩФ (ALP) в клеточных лизатах определяли с помощью анализа на основе ПНФФ (PnPP). Уровни коллагена в клеточных лизатах определяли с помощью анализа на основе красителя Sircoll. Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, увеличивал активность ЩФ (ALP) (11% - 42,8%) и уровни коллагена (3,2% - 45,3%) в линии клеток остеобластов человека (MG-63).

Пример 4:

Другое исследование было проведено для рассмотрения влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на ключевые пути передачи сигналов, которые играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на модуляцию ключевых сигнальных путей определяли в клеточных анализах с использованием технологий GeneBLAzer и Tango.

Было видно, что рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, ингибировал следующие пути: MAPK/EGFR/Ras/Raf, каннабиноидный рецептор 2 (CNR2), IL-4/STAT, PI3K/AKT/FOXO3 и TNF-α/JNK, что дополнительно усиливает предполагаемую роль лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологов, в свою пользу в случае ревматоидного артрита.

Эксперименты *in vivo*

Пример 5:

Другое исследование было проведено для проверки влияния рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на воспалительные цитокины (ФНО-α (TNF-α) и IL-6) на модели ЛПС (LPS)-индуцированного высвобождения цитокинов у мышей.

30 самок мышей C56BL6 были рандомизированы по весу тела и разделены на пять групп (n=6). Группам, подвергавшимся воздействию ЛПС (LPS) (G2), внутрибрюшинно (в/б) вводили однократную дозу ЛПС (LPS) 50 мкг/животное. Для групп, подвергавшихся воздействию рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 по 10 и 20 мг/кг + ЛПС (LPS), (G3 и G4) однократная внутрибрюшинная инъекцию 10 и 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, вводилась за 1 час до инъекции ЛПС (LPS). Для группы дексаметазона (G5), 1 мг/кг + ЛПС (LPS), однократная в/б инъекция 1 мг/кг дексаметазона вводилась за 1 час мин до инъекции ЛПС (LPS). Нормальным контрольным животным (G1) вводили трис-забуференный физиологический раствор (TBS) внутрибрюшинно в объеме дозы 5 мл/кг.

Кровь забирали через 90 минут после получения ЛПС (LPS), и кровь центрифугировали для забора сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -80 °C. Сывороточный ФНО-α (TNF-α) и IL-6 измеряли с применением набора ИФА (ELISA).

Сывороточные уровни цитокинов

ФНО-α (TNF-α) составлял 102,3 ± 9,2 пг/мл в сыворотке мышей, получавших трис-забуференный физиологический раствор (TBS), в то время как концентрация IL-6 в сыворотке мышей, получавших трис-забуференный физиологический раствор (TBS), составляла 204,0 ± 14,3 пг/мл.

Значительное повышение сывороточного уровня ФНО-α (TNF-α) наблюдалось в группе ЛПС (LPS) через 90 минут до среднего значения 675,7 ± 76,6 пг/мл. Это было ингибировано рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 до 566,2 ± 52,3 и 471,8 ± 48,3 пг/мл для 10 мг/кг и 20 мг/кг соответственно, что давало процентное снижение на 16,2% и 30,2% соответственно.

Значительное повышение сывороточного уровня IL-6 наблюдалось в группе ЛПС (LPS) через 90 минут до среднего значения 3256,0 ± 203,1 пг/мл. Это было ингибировано рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 до 2601,3 ± 268,2 и 1866,2 ± 139,3 пг/мл для 10 мг/кг и 20 мг/кг соответственно, что давало процентное снижение на 20,1% и 42,7% соответственно.

Вкратце, показано, что лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или его гомологи, обладает многообещающей противовоспалительной активностью благодаря его способности подавлять провоспалительные цитокины, ФНО-α (TNF-α) и IL-6 в мышиной модели ЛПС (LPS)-индуцированного воспаления.

Пример 6:

Другое исследование было проведено, чтобы увидеть эффект рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на крысиной модели адъювант-индуцированного артрита.

Адъювантный артрит индуцировали инъекцией 100 мкл (0,5 мг) обезвоженной *Mycobacterium butyricum* - полного адъюванта Фрейнда-CFA (Chondrex) в левую заднюю лапу (день 0) 34 крыс. В день 0 эксперимента было отобрано 24 животных, рандомизировано и распределено в четыре группы по 6 животных в каждой.

Группы были следующими:

G1: нормальный контроль

G2: контроль адъювант-индуцированного артрита АИА (AIA) + трис-забуференный физиологический раствор (TBS)

G3: АИА (AIA) + 10 мг/кг рекомбинантного лектина

G4: АИА (AIA) + 20 мг/кг рекомбинантного лектина

G5: АИА (AIA) + 0,5 мг/кг дексаметазона

Рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, соединение вводили с дня 8 по день 28 двоим группам (G3 и G4) после инъекции адъюванта, всего в течение 21 дня получения. Контрольным группам вводили следующее. Нормальным контрольным животным (G1, n=6) вводили 100 мкл парафинового масла в левую заднюю лапу в день 0, а затем дозировали в дни с 8 по 28 трис-забуференный физиологический раствор, 5 мл/кг, в/б. Другая контрольная группа получала полный адъювант Фрейнда, ПАФ (CFA) в день 0 с последующей внутрибрюшинной инъекцией трис-забуференного физиологического раствора в дни с 8 по 28 (G2). Группам, получавшим рекомбинантный лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, вводили в/б инъекцию 10 и 20 мг/кг лекарства (G3 и G4 соответственно) ежедневно в течение 21 дня (дни с 8 по 28). Для группы дексаметазона (G5) в/б инъекция 0,5 мг/кг дексаметазона вводилась ежедневно в течение 21 дня (дни с 8 по 28) после ПАФ (CFA) в день 0.

Толщину лапы измеряли цифровым микрометром (Mitutoyo). Также регистрировался угол голеностопного сустава в градусах. На 28 день после инъекции адъюванта и на 21 день после получения лечения у животных забирали цельную кровь и центрифугировали для отделения сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -80 °C. Сывороточные мочевую кислоту, С-реактивный белок, СРБ (CRP) и IL-6 измеряли с применением наборов, упомянутых ниже.

Наименование набора	**Производитель**	**Каталожный №**
Набор для ИФА (ELISA) крысиного С-реактивного белка, СРБ (CRP)	CUSABIO	CSB-E07922r
Набор для ИФА (ELISA) крысиного интерлейкина 6, IL-6	CUSABIO	CSB-E04640r

Набор для ИФА крысиной мочевой кислоты, МК (UA)	MYBIOSOURCE	MBS9346935

Оценка разрушения сустава (рентгенологическое определение):

В день забоя (28 день) была отделена задняя конечность ниже тазобедренного сустава. Были сделаны рентгенограммы задней конечности. Степень повреждения кости на рентгенограммах оценивалась по степени периостита и деструкции кости.

Рентгенография задней конечности группы с адъювант-индуцированным артритом, получавшей носитель (G2), выявила серьезную дезорганизацию (периостит и разрушение) костей в дистальных отделах большеберцовой кости, предплюсны, плюсны и пяточной кости. 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, умеренно улучшил состояние этого периостита и деструкции кости (G4), тогда как 10 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 показали ощутимый эффект (G3). Дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б показал значительное улучшение (G5).

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на рентгенографии области лодыжки в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Рентгенография голеностопного сустава группы с адъювант-индуцированным артритом, получавшей носитель (G2), показала серьезное разрушение кости по сравнению с нормальными животными (G1). 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 10 мг/кг и 20 мг/кг (G3 и G4) рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, улучшил состояние кости от слабой до умеренной степени. Дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б показал значительное улучшение (G5).

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на угол сустава (подвижность сустава) в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель (G2), показала значительное уменьшение угла сустава по сравнению с нормальной контрольной группой (G1).

21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 10 мг/кг и 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (G3 и G4), дозозависимо увеличивал подвижность суставов с улучшением в процентах на 7,9% и 34,2% соответственно. Дексаметазон 0,5 мг/кг, показал значительное улучшение (G5) в размере 61.8%.

Ингибиторное влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на толщину лапы и области лодыжки в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель (G2), показала значительное увеличение толщины лапы и области лодыжки. 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, значительно уменьшил отек лапы и области лодыжки (G4), тогда как 10 мг/кг продемонстрировали плохой эффект (G3). Дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б, показал значительное улучшение (G5).

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на сывороточные уровни мочевой кислоты в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Дексаметазон значительно снижал уровень сывороточной мочевой кислоты (G5) у адъювант-индуцированных крыс с артритом. 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 в дозах 10 мг/кг и 20 мг/кг (G3 и G4), зависимо снижал уровень мочевой кислоты с процентным снижением на 11,0% и 22,0%, соответственно.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, на сывороточные уровни IL-6 и СРБ (CRP) в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

С-реактивный белок, СРБ (CRP) составлял 290,6 ± 15,5 пг/мл в сыворотке крыс, получавших трис-забуференный физиологический раствор (TBS) (G1), в то время как концентрация IL-6 в сыворотке крыс, получавших трис-забуференный физиологический раствор (TBS), составляла 265,8 ± 22,7 пг/мл. Значительное повышение сывороточного уровня IL-6 наблюдалось в группе артрита (G2) до среднего значения 6989,2 ± 475,2 пг/мл. Это было ингибировано рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, до

6219,8 ± 359,8 и 5393,6 ± 420,4 пг/мл для дозирований 10 мг/кг и 20 мг/кг соответственно (G3 и G4), давая процентное снижение 11,0% и 22,8% соответственно.

Значительное повышение сывороточного уровня СРБ (CRP) наблюдалось в группе артрита (G2) до среднего значения 748,2 ± 21,8 пг/мл. Это было ингибировано рекомбинантным лектином, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, до 726,4 ± 36,6 и 523,3 ± 110,5 пг/мл для 10 мг/кг и 20 мг/кг (G3 и G4), соответственно, давая процентное снижение 2,9% и 30,1% соответственно.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и дексаметазона на вес тимуса и селезенки в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель (G2), показала значительное снижение веса тимуса по сравнению с нормальной контрольной группой (G1). 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 10 мг/кг и 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (G3 и G4), показал прирост 14,48% и потерю 3,98% соответственно по сравнению с группой G2. Дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б, показал заметное снижение (т.е. 19,33%) веса тимуса по сравнению с группой G2.

Группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель (G2), показала незначительное увеличение веса селезенки по сравнению с нормальной контрольной группой (G1). 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 10 мг/кг и 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (G3 и G4), показал увеличение на 40,55% и 12,17% соответственно по сравнению с группой G2. Дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б, показал значительное снижение (т.е. 51,57%) веса селезенки по сравнению с группой G2.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и дексаметазона на гематологию в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

В группе с адъювант-индуцированным артритом, получавшей носитель (G2), наблюдались от умеренного до значительного изменения всех тестируемых гематологических параметров по сравнению с нормальной контрольной группой (G1). 21 день введения путем внутрибрюшинной инъекции 10 мг/кг и 20 мг/кг рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (G3 и G4), не повлиял на изменения,

вызванные артритом. Тем не менее, дексаметазон 0,5 мг/кг, в/б, показал изменения от умеренных до значительных (т.е. снижение лейкоцитов на 60,3%, эритроцитов - на 23,4%, увеличение Hb-25,2% и увеличение гематокрита (HCT)-22,4%) в гематологии по сравнению с группой G2.

Влияние рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и дексаметазона на вес тела в крысиной модели адъювант-индуцированного артрита

Группы, получавшие рекомбинантный лектин (G3 и G4), и группа с адъювант-индуцированным артритом, получавшая носитель (G2), показали сходную с нормальной контрольной группой (G1) тенденцию увеличения массы тела. Однако группа в/б дексаметазона 0,5 мг/кг (G5) не показала увеличения массы тела в течение всего периода получения.

Таблица 1.

Образец	**Ингибирование цитокинов (%)**	
	IL-8	**IL-6**
IFN-γ 100 нг/мл	Контроль	Контроль
IFN-γ 100 нг/мл + SEQ ID NO: 2 (нг/мл)		
1	22,4	46,3
10	27,9	49,4
250	14,9	31,9
500	11,2	23,7
1000	-40,8	-25,2

Таблица 2.

Образец	**Ингибирование цитокинов (%)**	
	ФНО-α (TNF-α)	**IL-1-β**
ЛПС (LPS) 25 нг/мл	Контроль	Контроль
ЛПС (LPS) 25 нг/мл + SEQ ID NO: 2 (нг/мл)		
1	24,8	30,4
10	18,6	24,4
25	29,2	23,5
100	32,9	27,6

500	26,1	26,7
1000	17,2	24,4

Таблица 3.

Образец	**Ингибирование ФНО-α (TNF-α) (%)**	
IFN-γ 100 нг/мл	Контроль	
IFN-γ 100 нг/мл + SEQ ID NO:2 (нг/мл)		
1	26,5	
10	6,1	
100	11,7	
500	11	

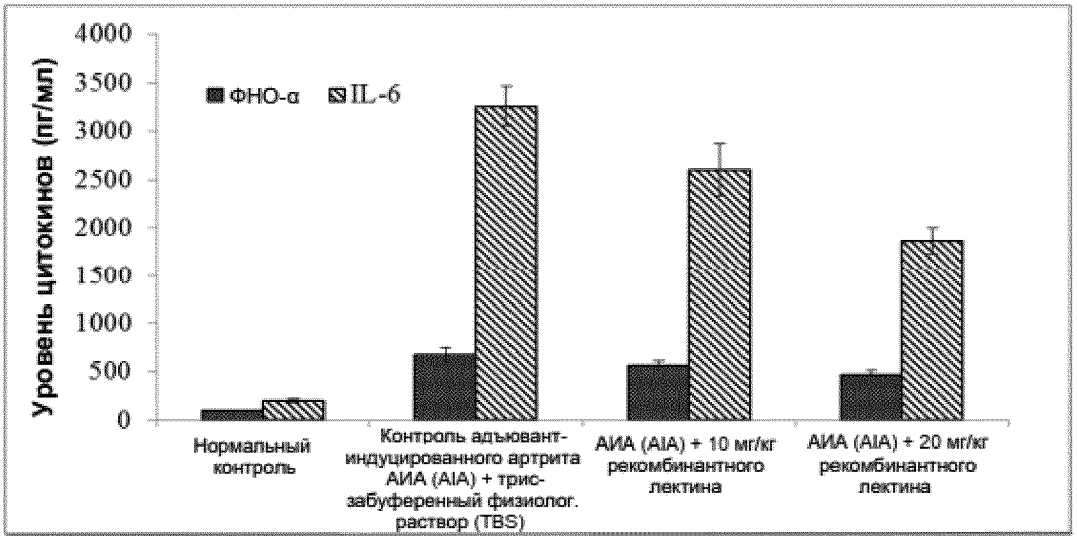
Таблица 4.

Образец	**% увеличения активности ЩФ (ALP) относительно контроля**	**% увеличения уровня коллагена**
Рекомбинантный лектин		
1	37,7	3,2
10	42,8	45,3
25	30,9	26,7
100	27,3	26,8
1000	11	13,5
Витамин D3 Положительный контроль		
1	31,6	14
10	60,8	30,9

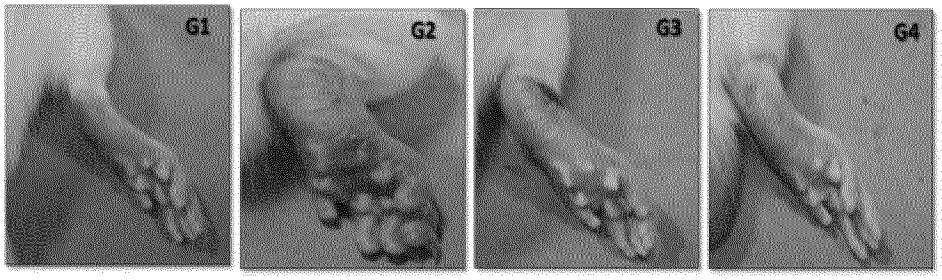
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок-лектин для применения в лечении или предотвращении воспаления у субъекта, нуждающегося в этом.
2. Белок-лектин для применения по пункту 1, характеризующийся тем, что белок-лектин содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO. 1.
3. Белок-лектин для применения по пунктам 1 или 2, характеризующийся тем, что белок-лектин содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с SEQ ID NO: 2, 3 или 4.
4. Белок-лектин для применения по пункту 2, характеризующийся тем, что белок-лектин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 4.
5. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что белок-лектин является рекомбинантным.
6. Белок-лектин для применения по любому из пунктов 2-4, характеризующийся тем, что аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с SEQ ID NO. 1.
7. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что белок-лектин способен ингибировать секрецию воспалительных цитокинов.
8. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, в которых белок-лектин способен снижать уровни С-реактивного белка, СРБ (CRP) в крови.
9. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что белок-лектин способен стимулировать активность ACP и/или уровни коллагена.
10. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что субъект страдает хроническим воспалительным заболеванием.
11. Белок-лектин для применения по пункту 9, характеризующийся тем, что хроническое воспалительное заболевание представляет собой псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит (РА), гепатит, астму, воспалительное заболевание кишечника (включая болезнь Крона, колит и синдром раздраженного кишечника (СРК)), височный артериит, атопический дерматит, системную волчанку, рассеянный склероз или саркоидоз.

12. Белок-лектин для применения по пункту 10, характеризующийся тем, что хроническое воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит (РА).
13. Белок-лектин для применения по одному из пунктов 1-8, характеризующийся тем, что у субъекта имеется острое воспаление.
14. Белок-лектин для применения по пункту 12, характеризующийся тем, что острое воспаление вызвано аллергической реакцией, инфекцией или травмой.
15. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что указанное лечение включает излечение воспаления или хронического воспалительного заболевания или уменьшение симптомов, связанных с воспалением.
16. Белок-лектин для применения по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что указанное предотвращение включает предотвращение начала воспаления или предотвращение или замедление прогрессирования хронического воспалительного заболевания.
17. Белок-лектин для применения по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанное лечение или предотвращение включает введение белка-лектина в дозе от 1 до 50 мг/кг.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая белок-лектин и фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество.
19. Способ лечения или предотвращения воспаления у субъекта, отличающийся тем, что указанный способ включает введение субъекту белка-лектина или фармацевтической композиции по пункту 18.
20. Способ по пункту 19, характеризующийся тем, что воспаление представляет собой воспалительное заболевание.
21. Способ по пункту 20, характеризующийся тем, что воспалительное заболевание представляет собой артрит.
22. Способ по одному из пунктов 19-21, характеризующийся тем, что белок-лектин представляет собой рекомбинантный лектин.
23. Способ по одному из пунктов 19-22, характеризующийся тем, что способ включает введение белка-лектина в дозе от 1 до 50 мг/кг.

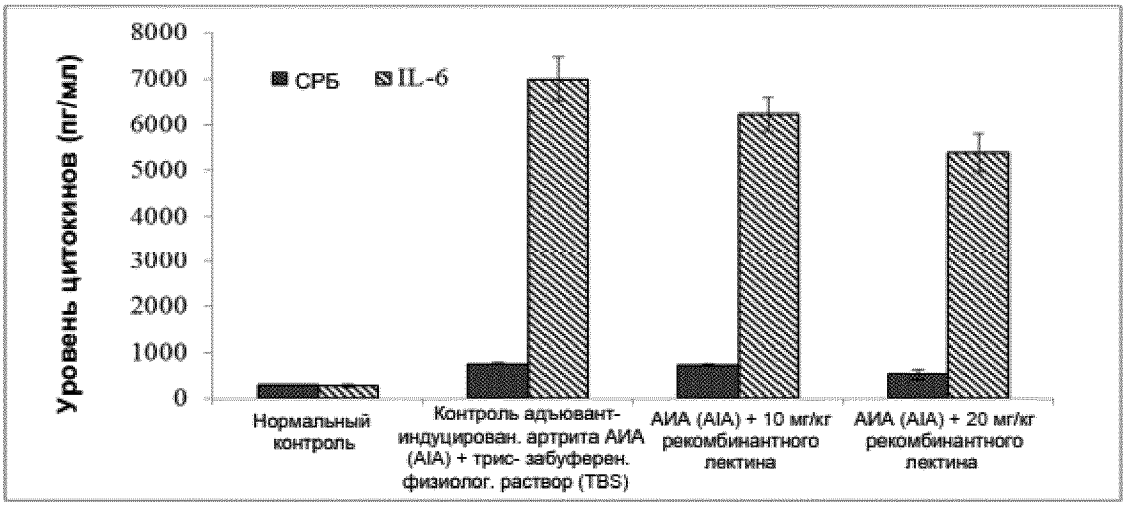


Фигура 1



Фигура 2

Фигура 3



Фигура 4