

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201791688** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2018.01.31

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

(22) Дата подачи заявки
2016.01.26

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

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

(32) **2015.01.26; 2015.12.30**

(33) **US**

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

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

(71) Заявитель:

**ЛУБРИС ЭлЭлСи; РОД АЙЛЕНД
ХОСПИТАЛ, Э ЛАЙФ СПЭН
ПАРТНЕР (US)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем описании описаны 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.

201791688
A1

201791688

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-544411EA/032

ПРИМЕНЕНИЕ PRG4 В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на дату подачи временной заявки США с серийным номером 62/107799, поданной 26 января 2015 года, и временной заявки с серийным номером 62/273059, поданной 30 декабря 2015 года, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Область изобретения

[0002] 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

[0003] Ген протеогликана 4 (PRG4) кодирует мегакариоцит-стимулирующий 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 муцин-подобном 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.

[0004] 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

[0005] 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.

[0006] 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 пузырь, роговицу глаза или на поверхностную ткань полости рта.

[0007] В одном варианте осуществления PRG4 вводят пациенту системно, например, посредством внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрибрюшинного, перорального, ректального, буккального или сублингвального введения, или посредством ингаляции.

[0008] 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.

[0009] 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, перикардиальной 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.

[0010] 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.

[0011] 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; атопического 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; глютеновой 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 Грэйвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; сенной 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.

[0012] В следующем варианте осуществления воспалительный ответ у пациента ассоциирован с воспалительным состоянием, которым страдает пациент.

[0013] 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 мкг/кг-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.

[0014] 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, GMCSF, 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.

[0015] 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.

[0016] 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.

[0017] В другом варианте осуществления PRG4 вводят локально указанному пациенту в клетки в или около нехрящевой ткани, неоссальной ткани, некостной ткани, и не ткани роговицы, мочевого пузыря или полости рта, которая является областью воспаления пациента.

[0018] 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.

[0019] 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.

[0020] 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 мкг/кг-4000 мкг/кг.

[0021] 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.

[0022] 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).

[0023] 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 мкг/кг-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.

[0024] 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.

[0025] 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.

[0026] Согласно одному варианту осуществления, воздействие на поверхность PRG4, например rhPRG4, 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.

[0027] 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, факталкин, 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.

[0028] 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.

[0029] 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 остеоцит, 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

[0030] 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 мкг/мл 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 ($p < 0,05$).

[0031] 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 мкг/мл 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 снижалось.

[0032] 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-гликозидаза 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-гликозидаза 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.

[0033] На фиг.4А-В представлено влияние обработки рекомбинантным протеогликаном 4 человека (rhPRG4) и высокомолекулярной гиалуроновой кислотой (HMW HA) на индуцируемую цитокинами пролиферацию фибробласт-подобных 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 ($p < 0,001$).

[0034] 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 ($p < 0,001$).

[0035] На фиг.6 представлена аминокислотная последовательность полноразмерного (не укороченного) PRG4 человека (SEQ ID NO: 1: 1404 остатка). Остатки 1-24 (показаны полужирным шрифтом) соответствуют сигнальной последовательности и остатки 25-1404 соответствуют зрелой последовательности PRG4 человека. Для гликопротеина не требуется, чтобы лидирующая последовательность была в ее активной форме.

[0036] На фиг.7 представлена последовательность нуклеиновой кислоты для гена PRG4 (SEQ ID NO: 2), кодирующего полноразмерный белок PRG4 человека из 1404 а.к.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 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.

[0040] 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.

[0041] 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 ТГ и лубрицином с ТГ. 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 ТГ отдельно и ТГ, дополненного лубрицином, и оно показано на столбиковой диаграмме на фиг.12В.

[0042] На фиг.13 представлен график, демонстрирующий уровни ЕРО, 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 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).

[0043] 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.

[0044] 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

[0045] 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.

[0046] 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

[0047] PRG4, также называемый лубрицином, представляет собой смазывающий полипептид, который у человека экспрессируется с гена мегакариоцит-стимулирующего 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, андиадгезивного и пограничного смазывающего вещества. Молекула имеет длинный центральный муцин-подобный 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 $\beta(1-3)\text{Gal-GalNAc}$, причем $\beta(1-3)\text{Gal-GalNAc}$ обычно имеет на конце сиаловую кислоту или N-ацетилнейраминовую 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 гемопексин-подобные и соматомедин-подобные области. Центральное расположенный экзон 6 содержит 940 остатков. Экзон 6 кодирует богатый повторами O-гликозилированный муцин-подобный домен.

[0048] 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/US014/061827.

[0049] 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.

[0050] 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 КЕРАРТТ, предпочтительно вместе с O-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 кДа 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 кДа до приблизительно 280 кДа.

[0051] 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/US014/061827.

[0052] 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 вара-перикардита (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

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] 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 эпителия толстого кишечника, имеют тенденцию к развитию в HA-богатой микросреде, где рецепторы CD44 на эпителиальных опухолевых клетках активируют опосредуемый тирозинкиназой каскад выживания клеток, что приводит к неконтролируемому делению 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 (Rouschor KMA *et al.* *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2034-43).

[0056] 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 зависимые 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).

[0057] 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 С3а, CD3, CD46).

[0058] 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.

[0059] Другой механизм, посредством которого PRG4 обеспечивает противовоспалительный эффект, открытый заявителями, представляет собой механизм подавления транслокации NF- κ B. NF- κ B 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- κ B 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- κ B ассоциирована со злокачественной опухолью, воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, септическим шоком, вирусной инфекцией и ненадлежащим иммунным развитием. Каскад передачи сигнала NF- κ B давно считался

прототипным провоспалительным каскадом. Активация передачи сигнала NF- κ B запускается серией стадий через один из трех известных путей: канонический, неканонический и атипичный независимый от I κ K путь. В неактивированном состоянии NF- κ B связан с I κ B. Активирующий сигнал (например, связывание TNF- α , IL-1 α , LPS, CD40, лимфотоксина, UV, HER2/Neu, H₂O₂ или другой лиганд) вызывает фосфорилирование I κ B и запускает его деградацию. Затем свободный несвязанный NF- κ B может транслоцироваться в ядро и активировать транскрипцию, например, провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии.

[0060] Как показано в примере 1F ниже, введение лубрицина может индуцировать транслокацию NF- κ B в модели фибробласт-подобных синовиоцитов ревматоидного артрита. Оказалось, что эффект PRG4 на транслокацию NF- κ B 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- κ B. Оно включает воспалительные состояния, поскольку NF- κ B представляет собой фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию экспрессии многих провоспалительных цитокинов, продуцируемых как врожденной, так и адаптивной иммунной системой.

[0061] 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.

[0062] 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 и образование локализованного клеточного дебриса, 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.

[0063] 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.

[0064] 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

[0065] 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.

[0066] 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.

[0067] 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.

[0068] 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.

[0069] 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.

[0070] В то время как пациентом предпочтительно является человек, пациентом может быть любое млекопитающее, например, лошадь, корова, свинья, крыса, мышь, собака или кошка.

[0071] Хотя лубрицин продуцируется естественным образом в организме, эффекты изобретения наблюдают, 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.

[0072] 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 мкг/кг до 4000 мкг/кг, или от 0,1 мкг/кг до 1000 мкг/кг, или от 0,1 мкг/кг 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 осуществления лубрицин вводят в концентрациях не более 60 мкг/мл.

[0073] 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.

[0074] 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.

[0075] 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.

[0076] 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, внутрикожная, внутрибрюшинная или чресслизистая доставка.

[0077] 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 ткани 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 несуставной, и не является роговицей, 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.

[0078] 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.

[0079] Для применения изобретения на практике PRG4 можно составлять в носителе, например, суспендировать в фосфатно-

солевом буфере, в концентрациях в диапазоне от 1 мкг/мл до 1000 мкг/мл и более предпочтительно 100-500 мкг/мл. Подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor 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, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0080] 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.

[0081] 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, глютеновая болезнь и т.д.) и неврологические заболевания.

[0082] 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 аллопецию; аутоиммунное заболевание; аутоиммунный гипертиреозидизм; аутоиммунный гипопитуитаризм; аутоиммунное плюригландулярное заболевание; болезнь Бехчета; повреждение головного мозга; бронхит; злокачественную опухоль; реперфузионный синдром; кардиоренальный синдром; глютеновую 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; псориатический артрит, ладонно-подошвенный пустулез; гангренозную пиодермию; респираторную аллергию; воспаление сетчатки; ретинит; ревматоидный артрит; склеродермию; сепсис; сывороточную болезнь; синдром Сезари; синдром Шегрена; кожную аллергию; инсульт; синдром системного воспалительного ответа (SIRS); системную красную волчанку; системную склеродермию; заболевания, обусловленные гиперчувствительностью, опосредуемой Т-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.

[0083] 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.

[0084] 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.

[0085] 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.

[0086] 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, остеоцит, остеобласт, клетку сетчатки, лимбальную клетку, клетку трабекулярной сети, клетку роговицы, клетку конъюнктивы, клетку глаза или офтальмическую клетку, PRG4 вводят пациенту системно.

[0087] 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-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 , CXCL11 (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 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.

[0088] 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.

[0089] 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.

[0090] 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.

[0091] Согласно одному варианту осуществления клетка,

экспрессирующая CD44, включает белые клетки крови (т.е., лейкоциты), такие как лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки, НК-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 стволовые клетки.

[0092] 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.

[0093] 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.

[0094] В одном варианте осуществления этого способа лубрицин 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 лубрицин вводят в количестве в диапазоне от 0,1 мкг/кг до 4000 мкг/кг. В одном варианте осуществления лубрицин вводят системно, т.е. посредством внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекции, хотя его можно вводить локально.

[0095] 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.

[0096] 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 лубрицин 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 лубрицин 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 лубрицин можно вводить одновременно с

химиотерапевтическим или радиологическим лечением злокачественной опухоли. Таким образом, в одном варианте осуществления лубрицин вводят пациенту, имеющему злокачественную опухоль, где лубрицин вводят для лечения злокачественной опухоли или где лубрицин 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.

[0097] 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 Кастлемена, 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 яичника, 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.

[0098] 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 лубрицины приводят 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.

[0099] 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.

[00100] 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 инъецировать 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.

[00101] 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.

[00102] 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, сенсibiliзируя 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.

[00103] 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 JR, Lloyd CM. 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.

[00104] 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 предотвращения адгезии и миграции фибробластов, которое снизит общий фиброзный ответ.

[00105] 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.

[00106] 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.

[00107] 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.

[00108] 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 TH *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 HA. В одном варианте осуществления инъецированный rhPRG4 снижает воспаление и обеспечивает улучшенный кровоток и выживаемость клеток сетчатки. В другом варианте осуществления rhPRG4, инъецированный в глаз, препятствует опосредуемой CD44 закупорке трабекулярной сети при первичной открытоугольной глаукоме, что приводит к снижению внутриглазного давления. В другом варианте осуществления rhPRG4 инактивирует растворимый CD44 во внутриглазной жидкости, препятствуя цитотоксичности растворимого CD44. В другом варианте осуществления rhPRG4 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.

[00109] В другом варианте осуществления изобретения rhPRG4 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.

[00110] 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.

[00111] 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 , 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 или GCSF.

[00112] 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.

[00113] 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.

[00114] В одном варианте осуществления лубрицин вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания, т.е. его вводят в диапазоне от 0,1 мкг/кг 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.

[00115] В конкретном варианте осуществления клетка находится в пациенте, страдающем или имеющем риск развития сепсиса, например, вызванного воздействием вирусных или бактериальных токсинов, таких как LPS, флагеллин и т.п. Таким образом, в одном аспекте лубрицин предлагается для лечения сепсиса.

[00116] 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.

[00117] В следующем варианте осуществления опосредуемое PRG4 снижение или ингибирование транслокации NF- κ B 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

[00118] Для оценки взаимодействия между протеогликаном 4 человека и рецептором CD44 и последствия этого взаимодействия для индуцируемой провоспалительными цитокинами пролиферации синовиоцитов проводили следующие эксперименты.

[00119] 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. Фибробласт-подобные синовиоциты ревматоидного артрита (RA-FLS) стимулировали интерлейкином-1 бета (IL-1 β) или фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) в течение 48 часов 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-1 β или TNF- α в присутствии

или в отсутствие IM7.

[00120] 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 \pm стандартное отклонение.

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

[00121] 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% бычьим сывороточным альбумином (BSA; 300 мкл на лунку) в течение по меньшей мере 2 часов 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.

[00122] Связывание rhPRG4, HMW HA, MMW HA и витронектина со слитым белком CD44-Fc IgG₁ и Fc IgG₁ представлено на фиг.1А. 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.

[00123] 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.

1B. 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

[00124] 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 величины 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.1B. 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.

[00125] 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 часов 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 минут 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 величины 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.

[00126] 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 ($p < 0,05$).

[00127] 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

[00128] 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 инжестировали 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 инжестировали 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 инжестировали в концентрациях в диапазоне от 0 до 300 мкг/мл, как описано выше. После завершения фазы диссоциации HMW HA инжестировали 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 НМВ НА с CD44 после инъекции rhPRG4.

[00129] Связывание rhPRG4 с рекомбинантным CD44 подтверждали с использованием поверхностного плазмонного резонанса. rhPRG4 демонстрировал зависимость от концентрации ассоциацию с и диссоциацию от иммобилизованного CD44-Fc IgG₁ (фиг.2А) с кажущейся $K_d \approx 38$ нМ, исходя из молекулярной массы rhPRG4 240 кДа. rhPRG4 препятствовал связыванию НМВ НА с рекомбинантным CD44, как показано по обратной связи между интенсивностью сигнала связывания НМВ НА (ось x) и интенсивностью сигнала связывания rhPRG4 (ось y) (фиг.2В).

[00130] Эти данные демонстрируют, что rhPRG4 связывается с CD44 зависимым от концентрации образом со сравнимой аффинностью с НМВ НА. Кроме того, как продемонстрировано в примере 1В и 1С, присутствие rhPRG4, связанного с CD44, препятствовало связыванию НМВ НА с CD44 зависимым от концентрации образом и может указывать на то, что rhPRG4 и НМВ НА обладают общим участком связывания на рецепторе. Ожидается, что в окружении сустава, где концентрация НА 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 НА, 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

[00131] 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).

[00132] rhPRG4 расщепляли с использованием сиалидазы А (Prozyme, США), O-гликозидазы (New England Biolabs, США) или комбинации сиалидазы А и O-гликозидазы в течение 16 часов 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 миллионов единиц/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.

[00133] 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 О-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 О-гликозидазой rhPRG4 ($p=0,105$). Процентное связывание с CD44 расщепленного сиалидазой-А и О-гликозидазой rhPRG4 было значимо более высоким, чем процентное связывание расщепленного сиалидазой-А rhPRG4 ($p=0,007$), расщепленного О-гликозидазой rhPRG4 ($p<0,001$) и необработанного контроля ($p<0,001$). Расщепление rhPRG4 сиалидазой-А и О-гликозидазой приводило к снижению кажущейся молекулярной массы rhPRG4 до приблизительно 200 кДа (фиг.3В).

[00134] Удаление сиаловой кислоты и О-гликозилирования значимо повышало связывание CD44 с rhPRG4 ($p<0,001$). Обработка сиалидазой-А и О-гликозидазой по отдельности приводила к повышению связывания rhPRG4 с рецептором CD44. Совокупное расщепление сиалидазой-А и О-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 О-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.

1Е. Индуцируемая провоспалительными цитокинами пролиферация фибробласт-подобных синовиоцитов ревматоидного артрита и влияние обработки посредством rhPRG4 или НМВ НА.

[00135] 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). Фибробласт-подобные 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).

[00136] Для проведения этих экспериментов использовали фибробласт-подобные 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 часов 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.

[00137] Индуцированная IL-1 β и TNF- α пролиферация RA-FLS в течение 48 часов 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.

[00138] 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.

[00139] 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.* *Артрит 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.

[00140] 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 κ B в ядро после стимуляции RA-FLS посредством TNF- α

[00141] 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 κ B MG 132 (3 мкМ; Tocris Bioscience) в течение 24 часов 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. Субъединицу p50 NF κ B выявляли в экстракте ядер с использованием коммерчески доступного набора для анализа связывания ДНК NF κ B (Abcam). Данные представлены в виде

крастности изменения уровней ядерного NFκB по сравнению с необработанным контролем. Для оценки того, является ли ингибирование транслокации NFκB 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.

[00142] Обработка TNF-α приводила к значительной транслокации NFκB в ядро по сравнению с необработанными контролями ($p < 0,001$) (фиг.4С). Обработка rhPRG4 или ингибитором транслокации NFκB MG132 на значимом уровне снижала транслокацию NFκB в ядро по сравнению с обработанными TNF-α RA-FLS ($p < 0,001$). Транслокация NFκB в ядро в группе TNF-α+rhPRG4+IM7 была значимо более высокой, чем транслокация NFκB 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 NFκB 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

[00143] 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 часов 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.

[00144] Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} синовиоциты выращивали в предметных стеклах с лунками (Thermo Scientific). Клетки

фикси́ровали в 4% 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 часа 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.

[00145] Иммуногистохимия CD44 Prg4^{-/-} и Prg4^{+/+} синовиоцитов представлена на фиг.5А. 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-1 β и TNF- α приводила к значимому повышению пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов по сравнению с необработанными Prg4^{-/-} синовиоцитами ($p < 0,001$) (фиг.5В). Напротив, только стимуляция IL-1 β приводила к значимому повышению пролиферации Prg4^{+/+} синовиоцитов по сравнению с необработанными Prg4^{+/+} синовиоцитами ($p < 0,001$). Кроме того, кратное повышение индуцируемой IL-1 β и TNF- α пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов было значимо более высоким, чем кратное повышение индуцируемой цитокинами пролиферации Prg4^{+/+} синовиоцитов ($p < 0,001$).

[00146] Обработка rhPRG4 значимо ингибировала индуцируемую IL-1 β и TNF- α пролиферацию Prg4^{-/-} синовиоцитов ($p < 0,001$) (фиг.5С). Совместная обработка с IM7 обращала вспять эффект

rhPRG4. Это иллюстрируется значимым увеличением ($p < 0,001$) пролиферации Prg4^{-/-} синовиоцитов в группах IL-1 β +rhPRG4+IM7 и TNF- α +rhPRG4+IM7 по сравнению с IL-1 β +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 ($p < 0,001$).

[00147] 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

[00148] 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 минут при 37°C. Эти смеси центрифугировали и супернатант плазмы анализировали в отношении 14 биомаркеров воспаления с использованием высокочувствительной матрицы цитокинов на устройстве для считывания Randox Invesitigator 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 , IL1- 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 .

[00149] 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 минут, 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.

[00150] 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 минут 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, IL1 β 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.

[00151] 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 минут 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 минут 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.

[00152] Эффект лубрицина на опосредуемое рекомбинантным тканевым фактором (TF) образование воспалительных цитокинов исследовали с использованием технологии Biochip Array. В этих исследованиях использовали тканевой 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 тканевой 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.12А-В, 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.12В, лубрицин обеспечивал выраженное снижение уровней TNF- α и VEGF в образцах, к которым был добавлен тканевой 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.

[00153] Эти исследования показывают, что лубрицин способен ингибировать образование различных воспалительных цитокинов в цельной крови, в которую был добавлен бактериальный липополисахарид (LPS), TNF- α и тканевой 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*

[00154] 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 Lumines. 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, секретлируемых остеоартритическими синовиоцитами человека

[00155] Клетки синовиальной жидкости получали от здоровых пациентов и пациентов с остеоартритом (ОА) и очищали по CD90+ после истощения иммунных клеток. Клетки высевали в количестве 10000 на лунку и суспендировали в среде, содержащей DMEM, инактивированный нагреванием FBS Hyclone (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 часов, после чего супернатанты собирали для анализа цитокинов посредством мультиплексной платформы Luminex. Как показано на фиг.14A-B, 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

[00156] 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 CVA и TIA 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. Иммунный 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.

[00157] 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.

[00158] 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.

[00159] Инъекция флуоресцентно меченного 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.

[00160] 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, наблюдаемая 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

[00161] 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-резервуаро-анальная 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 rhPRG4 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 rhPRG4 в концентрациях в диапазоне от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл, более предпочтительно в объемах от 200 мл до 500 мл в концентрациях от 50 мкг/мл 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 rhPRG4 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 часов перед введением лубрицина, после чего следует соответствующее голодание.

Пример 7. Лечение подагры

[00162] В качестве модели подагры исследовали крыс, которым проводили инъекцию кристаллов урата натрия. Через 24 часа 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 rhPRG4 через 24 часа после введения кристаллов урата. Этих крыс исследовали каждые 12 часов 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 rhPRG4, имели меньшую боль, чем крысы, которым вводили плацебо.

[00163] 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.

[00164] 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> LUBRIS LLC

<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 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

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
805 810 815

Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys
820 825 830

Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Glu
835 840 845

Thr Pro Pro Pro Thr Thr Ser Glu Val Ser Thr Pro Thr Thr Thr Lys
850 855 860

Glu Pro Thr Thr Ile His Lys Ser Pro Asp Glu Ser Thr Pro Glu Leu
865 870 875 880

Ser Ala Glu Pro Thr Pro Lys Ala Leu Glu Asn Ser Pro Lys Glu Pro
885 890 895

Gly Val Pro Thr Thr Lys Thr Pro Ala Ala Thr Lys Pro Glu Met Thr
900 905 910

Thr Thr Ala Lys Asp Lys Thr Thr Glu Arg Asp Leu Arg Thr Thr Pro

915

920

925

Glu Thr Thr Thr Ala Ala Pro Lys Met Thr Lys Glu Thr Ala Thr Thr
 930 935 940

Thr Glu Lys Thr Thr Glu Ser Lys Ile Thr Ala Thr Thr Thr Gln Val
 945 950 955 960

Thr Ser Thr Thr Thr Gln Asp Thr Thr Pro Phe Lys Ile Thr Thr Leu
 965 970 975

Lys Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Val Thr Thr Thr Lys Lys Thr Ile
 980 985 990

Thr Thr Thr Glu Ile Met Asn Lys Pro Glu Glu Thr Ala Lys Pro Lys
 995 1000 1005

Asp Arg Ala Thr Asn Ser Lys Ala Thr Thr Pro Lys Pro Gln Lys
 1010 1015 1020

Pro Thr Lys Ala Pro Lys Lys Pro Thr Ser Thr Lys Lys Pro Lys
 1025 1030 1035

Thr Met Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys Thr Thr Pro Thr Pro Arg
 1040 1045 1050

Lys Met Thr Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn Pro Thr Ser Arg Ile
 1055 1060 1065

Ala Glu Ala Met Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro Asn Gln Thr Pro
 1070 1075 1080

Asn Ser Lys Leu Val Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu Asp Ala Gly
 1085 1090 1095

Gly Ala Glu Gly Glu Thr Pro His Met Leu Leu Arg Pro His Val
 1100 1105 1110

Phe Met Pro Glu Val Thr Pro Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg Val
 1115 1120 1125

Pro Asn Gln Gly Ile Ile Ile Asn Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr
 1130 1135 1140

Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro Val Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg
 1145 1150 1155

Asn Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg Gly His Tyr Phe Trp Met Leu

<210> 2

<211> 5041

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcggccgcga ctattcggta cctgaaaaca acgatggcat ggaaaacact tcccatttac	60
ctgttggtgc tgctgtctgt tttcgtgatt cagcaagttt catctcaaga tttatcaagc	120
tgtgcaggga gatgtgggga agggatttct agagatgcca cctgcaactg tgattataac	180
tgtcaacact acatggagtg ctgccctgat ttcaagagag tctgcactgc ggagctttcc	240
tgtaaaggcc gctgctttga gtccttcgag agagggaggg agtgtgactg cgacgcccaa	300
tgtaagaagt atgacaagtg ctgtcccgat tatgagagtt tctgtgcaga agtgcataat	360
cccacatcac caccatcttc aaagaaagca cctccacctt caggagcatc tcaaaccatc	420
aatcaacaa ccaaagcttc acccaaacca ccaaacaaga agaagactaa gaaagttata	480
gaatcagagg aaataacaga agaacattct gtttctgaaa atcaagagtc ctctctctcc	540
tcctctctct cctcttcttc ttcaacaatt tggaaaatca agtcttccaa aaattcagct	600
gctaatagag aattacagaa gaaactcaaa gtaaaagata acaagaagaa cagaactaaa	660
aagaaaccta ccccaaacc accagttgta gatgaagctg gaagtggatt ggacaatggt	720
gacttcaagg tcacaactcc tgacacgtct accacccaac acaataaagt cagcacatct	780
ccaagatca caacagcaaa accaataaat cccagaccca gtcttccacc taattctgat	840
acatctaaag agacgtcttt gacagtgaat aaagagacaa cagttgaaac taaagaaact	900
actacaacaa ataaacagac ttcaactgat ggaaaagaga agactacttc cgctaaagag	960
acacaaagta tagagaaaac atctgctaaa gatttagcac ccacatctaa agtgctggct	1020
aaacctacac ccaaagctga aactacaacc aaaggccctg ctctcaccac tcccaaggag	1080
cccacgcca cactccca ggagcctgca tctaccacac ccaaagagcc cacacctacc	1140
accatcaagt ctgcaccac ccccccaag gagcctgcac ccaccaccac caagtctgca	1200
cccaccactc ccaaggagcc tgcaccacc accaccaagg agcctgcacc caccactccc	1260
aaggagcctg caccaccac caccaaggag cctgcaccca ccaccaccaa gtctgcacc	1320
accactcca aggagcctgc accaccacc cccaagaagc ctgccccaac taccaccaag	1380
gagcctgcac ccaccactcc caaggagcct acaccacca ctcccaagga gcctgcacc	1440
accaccaagg agcctgcacc caccactccc aaagagcctg caccactgc cccaagaag	1500
cctgccccaa ctacccccaa ggagcctgca cccaccactc ccaaggagcc tgcaccacc	1560
accaccaagg agccttcacc caccactccc aaggagcctg caccaccac caccaagtct	1620
gcaccacca ctaccaagga gcctgcacc accactacca agtctgcacc caccactccc	1680

aaggagcctt	caccaccac	caccaaggag	cctgcaccca	ccactcccaa	ggagcctgca	1740
cccaccacc	ccaagaagcc	tgccccaact	acccccaagg	agcctgcacc	caccactccc	1800
aaggaacctg	caccaccac	caccaagaag	cctgcaccca	ccgctcccaa	agagcctgcc	1860
ccaactacc	ccaaggagac	tgaccccacc	acccccaaga	agctcacgcc	caccaccccc	1920
gagaagctcg	caccaccac	ccctgagaag	cccgcaccca	ccaccctga	ggagctcgca	1980
cccaccacc	ctgaggagcc	cacaccacc	accctgagg	agcctgctcc	caccactccc	2040
aaggcagcgg	ctcccaacac	ccctaaggag	cctgctccaa	ctaccctaa	ggagcctgct	2100
ccaactacc	ctaaggagcc	tgctccaact	accctaagg	agactgctcc	aactaccct	2160
aaagggactg	ctccaactac	cctcaaggaa	cctgcaccca	ctactcccaa	gaagcctgcc	2220
ccaaggagc	ttgcaccac	caccaccaag	gagcccacat	ccaccacctc	tgacaagccc	2280
gctccaacta	ccctaaggg	gactgctcca	actaccctta	aggagcctgc	tccaactacc	2340
cctaaggagc	ctgctccaac	tacccttaag	gggactgctc	caactaccct	caaggaacct	2400
gcaccacta	ctccaagaa	gcctgcccc	aaggagcttg	caccaccac	caccaagggg	2460
cccacatcca	ccacctctga	caagcctgct	ccaactacac	ctaaggagac	tgctccaact	2520
acccccaagg	agcctgcacc	cactaccccc	aagaagcctg	ctccaactac	tcttgagaca	2580
cctctccaa	ccacttcaga	ggtctctact	ccaactacca	ccaaggagcc	taccactatc	2640
cacaaaagcc	ctgatgaatc	aactcctgag	ctttctgcag	aaccacacc	aaaagctctt	2700
gaaaacagtc	ccaaggaacc	tggtgtacct	acaactaaga	ctcctgcagc	gactaaacct	2760
gaaatgacta	caacagctaa	agacaagaca	acagaaagag	acttacgtac	tacacctgaa	2820
actacaactg	ctgcacctaa	gatgacaaaa	gagacagcaa	ctacaacaga	aaaaactacc	2880
gaatcaaaa	taacagctac	aaccacacaa	gtaacatcta	ccacaactca	agataccaca	2940
ccattcaaaa	ttactactct	taaaacaact	actcttgcac	ccaaagtaac	tacaacaaaa	3000
aagacaatta	ctaccactga	gattatgaac	aaacctgaag	aaacagctaa	accaaaagac	3060
agagctacta	attctaaagc	gacaactcct	aaacctcaaa	agccaaccaa	agcaccctaaa	3120
aaaccactt	ctaccaaaaa	gccaaaaaca	atgcctagag	tgagaaaacc	aaagacgaca	3180
ccaactccc	gcaagatgac	atcaacaatg	ccagaattga	accctacctc	agaatagca	3240
gaagccatgc	tccaaaccac	caccagacct	aaccaaactc	caactccaa	actagttgaa	3300
gtaaatccaa	agagtgaaga	tgaggtggt	gctgaaggag	aaacacctca	tatgcttctc	3360
aggcccatg	tgttcatgcc	tgaagttact	cccacatgg	attacttacc	gagagtacc	3420
aatcaaggca	ttatcatcaa	tccatgctt	tccgatgaga	ccaatatatg	caatggtaag	3480
ccagtagatg	gactgactac	tttgcgcaat	gggacattag	ttgcattccg	aggtcattat	3540
ttctggatgc	taagtccatt	cagtccacca	tctccagctc	gcagaattac	tgaagtttgg	3600

ggatattcctt	ccccattga	tactgttttt	actaggtgca	actgtgaagg	aaaaactttc	3660
ttctttaagg	attctcagta	ctggcgtttt	accaatgata	taaaagatgc	agggtacccc	3720
aaaccaatth	tcaaaggatt	tggaggacta	actggacaaa	tagtggcagc	gctttcaaca	3780
gctaaatata	agaactggcc	tgaatctgtg	tatthttttca	agagagggtg	cagcattcag	3840
cagtatattt	ataaacagga	acctgtacag	aagtgccctg	gaagaaggcc	tgctctaaat	3900
tatccagtgt	atggagaaat	gacacagggt	aggagacgtc	gctttgaacg	tgctatagga	3960
ccttctcaaa	cacacacat	cagaattcaa	tattcacctg	ccagactggc	ttatcaagac	4020
aaagggtgcc	ttcataatga	agttaaagtg	agtatactgt	ggagaggact	tccaaatgtg	4080
gttacctcag	ctatatcact	gcccacatc	agaaaacctg	acggctatga	ttactatgcc	4140
ttttctaaag	atcaactacta	taacattgat	gtgcctagta	gaacagcaag	agcaattact	4200
actcgttctg	ggcagacctt	atccaaagtc	tggtacaact	gtccttagac	tgatgagcaa	4260
aggaggagtc	aactaatgaa	gaaatgaata	ataaatthtg	acactgaaaa	acatthttatt	4320
aataaagaat	attgacatga	gtataccagt	ttatatataa	aatgtthttt	aaacttgaca	4380
atcattacac	taaaacagat	ttgataatct	tattcacagt	tgthtttggt	tacagacat	4440
ttaattaata	tttctctgt	ttattcctcc	tctccctccc	attgcatggc	tcacacctgt	4500
aaaagaaaaa	agaatcaaat	tgaatatatc	thttaagaat	tcaaaactag	tgtattcact	4560
taccctagtt	cattataaaa	aatatctagg	cattgtggat	ataaaactgt	tgggtattct	4620
acaacttcaa	tggaaattat	tacaagcaga	ttaatccctc	thtttgtagc	acaagtacaa	4680
tctaaaagtt	atattggaaa	acatggaaat	attaaaattt	tacactthta	ctagctaaaa	4740
cataatcaca	aagctthtatc	gtgthgtata	aaaaaattaa	caatataatg	gcaataggta	4800
gagatacaac	aatgaatat	aacactataa	cacttcatat	thtccaaatc	thaatthgga	4860
thtaaggaag	aatcaataa	atataaaata	taagcacata	thtattatat	atctaaggta	4920
tacaaatctg	tctacatgaa	gthttacagat	tggtaaatat	cacctgctca	acatgtaatt	4980
atthtaataa	actthtggaac	atthaaaaaa	thaatthggag	gctthaaaaa	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 снижения или ингибирования воспалительного ответа у пациента, включающий введение PRG4 пациенту, нуждающемуся в этом, в область, которая является не хрящевой, не оссальной, не костной и не суставной, и не является тканью роговицы, мочевого пузыря или полости рта.

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

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

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

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

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

7. Способ по любому из п.п.1-6, в котором PRG4 является эффективным для предотвращения передаче сигнала CD44.

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

9. Способ по п.1, в котором PRG4 вводят локально указанному пациенту в область, выбранную из кожи, почки, легких, печени, раны или хирургического разреза, щитовидной железы, поджелудочной железы, селезенки, тимуса, яичника, семенника, мочеточника, матки, надпочечника, гипофиза, гипоталамуса, мочеиспускательного канала, предстательной железы, сердца, артерии или сосуда, головного мозга, желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, ободочной кишки, пищевода, глотки, гортани, трахеи, языка, задней области глаза или опухоли.

10. Способ по п.9, в котором областью является область воспаления у пациента.

11. Способ по любому из предшествующих п.п., в котором пациент страдает воспалительным состоянием, выбранным 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 гипертиреозидизма; 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; контактного дерматита; болезни Крона; дерматомиозита; диабета; экземы; эмфиземы; отторжения инородного тела; глаукомы; гломерулонефрита; подагры; реакции "трансплантат против хозяина"; болезни Грэйвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; сенной 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; крапивницы; перикардита и витилиго.

12. Способ по п.2, в котором пациент страдает воспалительным состоянием, выбранным из группы, состоящей из

артрита, остеоартрита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, диабетической ретинопатии, воспаления сетчатки, ретинита, синдрома Шегрена, дегенерации желтого пятна, подагры, псевдоподагры, перикардита и увеита.

13. Способ по п.п.11 или 12, в котором воспалительный ответ у пациента ассоциирован с воспалительным состоянием, которым страдает пациент.

14. Способ по любому из предшествующих п.п., в котором PRG4 вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания у пациента.

15. Способ по любому из предшествующих п.п., в котором PRG4 вводят в количестве в диапазоне 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг или вводят локально для обеспечения покрытия посредством PRG4 из раствора PRG4.

16. Способ по любому из предшествующих п.п, в котором снижение или ингибирование воспалительного ответа поддается измерению по уровню продукции провоспалительного цитокина у пациента.

17. Способ по п.1, включающий лечение воспалительного заболевания кишечника путем введения лубрицина в кишечник пациента системно, ректально, перорально или их комбинацией.

18. Способ по п.1, включающий лечение повреждения головного мозга путем введения лубрицина в головной мозг пациента системно, местным путем в ходе хирургической операции или их комбинацией.

19. Способ по п.1, включающий лечение симптома аллергии у пациента, страдающего от симптома, выбранного из группы, состоящей из гиперемии, стекания слизи из носоглотки, кашля, свистящего дыхания, чихания, насморка, зудящей глотки, зудящей кожи, зудящих глаз и слезящихся глаз, причем способ включает стадию введения местным путем на поверхность ткани, демонстрирующей симптомы или имеющей риск их развития, количества композиции, содержащей PRG4, достаточного для смягчения симптома.

20. Способ по п.19, в котором композицию вводят интраназальным путем, перорально или посредством ингаляции.

21. 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 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 Грэйвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; сенной 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; крапивницы; перикардита и витилиго.

22. Способ по п.21, в котором PRG4 вводят пациенту системно.

23. Способ по п.22, в котором введение является внутривенным, внутривенным, ингаляционным, внутримышечным, подкожным, пероральным, ректальным, буккальным или сублингвальным.

24. Способ по п.21, в котором PRG4 вводят пациенту локально.

25. Способ по п.24, в котором PRG4 вводят местным путем или посредством инъекции.

26. Способ по любому из п.п.21-25, в котором PRG4 представляет собой экзогенный PRG4 человека.

27. Способ по любому из п.п.21-26, в котором PRG4 представляет собой рекомбинантный PRG4 человека.

28. Способ по любому из п.п.21-27, в котором PRG4 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 без сигнальной последовательности.

29. Способ по п.24 или 25, в котором указанный PRG4 вводят указанному пациенту в область, выбранную из кожи, почки, легких, печени, раны или хирургического разреза, щитовидной железы, поджелудочной железы, селезенки, тимуса, яичника, семенника, матки, надпочечника, гипофиза, гипоталамуса, мочеиспускательного канала, предстательной железы, сердца, артерии или сосуда, головного мозга, желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, ободочной кишки, пищевода, глотки, гортани, трахеи, языка или опухоли.

30. Способ по любому из п.п.21-29, в котором PRG4 вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания у пациента.

31. Способ по любому из п.п.21-30, в котором PRG4 вводят в количестве в диапазоне 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг или вводят локально для обеспечения покрытия посредством PRG4 из раствора

PRG4.

32. Способ по любому из п.п.21-31, в котором уменьшение или ингибирование воспалительного ответа является поддающимся измерению по уровню продукции провоспалительного цитокина у пациента.

33. Способ уменьшения или ингибирования воспалительного ответа у пациента в области, которая является не хрящевой, не оссальной, не костной и не суставной, и не является роговицей, мочевым пузырем или полостью рта, включающий введение PRG4 указанному пациенту, где указанный PRG4

a) связывает рецептор CD44 на клетке у указанного пациента;

b) снижает или ингибирует продукцию провоспалительного цитокина у указанного пациента;

и/или

d) снижает или ингибирует транслокацию NF-κB в клетке у указанного пациента,

тем самым снижая или ингибируя воспалительный ответ у указанного пациента.

34. Способ по п.33, в котором пациентом является человек.

35. Способ по п.33, в котором указанный PRG4 представляет собой рекомбинантный лубрицин человека.

36. Способ по п.33, в котором указанный рекомбинантный лубрицин человека имеет последовательность SEQ ID NO: 1 без сигнальной последовательности.

37. Способ по п.33, в котором указанный PRG4 представляет собой экзогенный лубрицин человека.

38. Способ по любому из п.п.33-37, в котором PRG4 вводят указанному пациенту системно.

39. Способ по п.38, в котором указанное системное введение является парентеральным или энтеральным.

40. Способ по п.38, в котором указанное системное введение является внутримышечным, внутривенным, внутрибрюшинным, пероральным, ректальным, сублингвальным, буккальным, сублабиальным, назальным или ингаляционным.

41. Способ по любому из п.п.33-35, в котором указанный PRG4

вводят локально указанному пациенту в область, которая является областью воспаления у указанного пациента, выбранной из кожи, почки, легких, печени, раны или хирургического разреза, щитовидной железы, поджелудочной железы, селезенки, тимуса, яичника, семенника, матки, надпочечника, гипофиза, гипоталамуса, мочеиспускательного канала, предстательной железы, сердца, перикарда, артерии или сосуда, головного мозга, желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, ободочной кишки, пищевода, глотки, гортани, трахеи, языка или опухоли.

42. Способ по любому из предшествующих п.п., в котором указанный пациент страдает воспалительным состоянием и воспалительный ответ ассоциирован с указанным воспалительным состоянием.

43. Способ по п.33, в котором 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; артрита; астмы; атеросклероза; атопического дерматита; аутоиммунной алопеции; аутоиммунного заболевания; аутоиммунного гипертиреозидизма; аутоиммунного гипопитуитаризма; аутоиммунного полигландулярного 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, контактного дерматита; болезни Крона; дерматомиозита; дерматомиозита; диабета; диабетической ретинопатии; экземы; эмфиземы; отторжения инородного тела; глаукомы; гломерулонефрита; подагры; реакции "трансплантат против хозяина"; болезни Грэйвса; синдрома Гийена-Барре; тиреоидита Хашимото; сенной 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; дегенерации желтого пятна; кольцевидной склеродермии; рассеянного склероза; фунгоидного микоза; инфаркта миокарда; некроза; неинфекционного повреждения легких; остеоартрита; панкреатита; пернициозной анемии; пневмонии; полимиозита; простатита; псевдоподагры; псориаза; псориатического артрита; ладонно-подошвенного пустулеза; гангренозной пиодермии; респираторной аллергии; воспаления сетчатки; ретинита; ревматоидного артрита; склеродермии; сепсиса; сывороточной болезни; синдрома Сезари; синдрома Шегрена; 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; крапивницы; увеита; перикардита или витилиго.

44. Способ по п.31, в котором клетка представляет собой тучную клетку, клетку селезенки, клетку легкого, клетку почки, клетку головного мозга, клетку сердца, клетку печени, клетку злокачественной опухоли, клетку кожи, эпителиальную клетку, эндотелиальную клетку, лейкоцит, лимфоцит, нейтрофил, эозинофил, базофил, моноцит, макрофаг, дендритную клетку, фибробласт, мышечную клетку, уретральную клетку, клетку сосуда, нервную клетку, клетку поджелудочной железы, клетку желудка, клетку кишечника, клетку ободочной кишки, клетку прямой кишки, клетку желчного пузыря, стволовую клетку или клетку щитовидной железы.

45. Способ по п.31, в котором клетка представляет собой синовиоцит, хондроцит, остеоцит, остеобласт, остеокласт, клетку сетчатки, лимбальную клетку, клетку трабекулярной сети, клетку роговицы, клетку конъюнктивы, клетку глаза или офтальмическую клетку, и PRG4 вводят пациенту системно.

46. Способ по любому из п.п.31-44, в котором PRG4 вводят в количестве в диапазоне 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг.

47. Способ по любому из п.п.31-45, в котором PRG4 вводят в количестве, недостаточном для обеспечения пограничного смазывания.

48. Способ по п.31, в котором 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 , 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 , MIP-CSF и GCSF.

49. Способ ингибирования связывания лиганда с CD44, находящимся на поверхности в области, которая является не хрящевой, не оссальной, не костной и не суставной, и не является роговицей, мочевым пузырем или полостью рта, причем способ включает воздействие на поверхность посредством PRG4, где PRG4 связывается с CD44 и ингибирует связывание лиганда.

50. Способ по п.48, в котором PRG4 представляет собой рекомбинантный PRG4 человека.

51. Способ по п.48 или 49, в котором PRG4 не присутствует на поверхности в количестве, достаточном для обеспечения пограничного смазывания.

52. Способ по п.50, в котором PRG4 вводят человеку системно в количестве в диапазоне 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг.

53. Способ по любому из п.п.49-52, в котором поверхность представляет собой клеточную мембрану млекопитающих.

54. Способ по п.53, в котором PRG4 вводят системно, и клетка представляет собой синовиоцит индивидуума с ревматоидным артритом, тучную клетку индивидуума с интерстициальным циститом, клетку селезенки диабетика, клетку легкого астматика, клетку почки, клетку головного мозга, клетку сердца, клетку печени, злокачественную клетку или эндотелиальную клетку индивидуума с

сепсисом.

55. Способ по п.53, в котором клетка представляет собой Т-клетку.

56. Способ по п.53, в котором клетка представляет собой лимфоцит, нейтрофил, фибробласт, злокачественную клетку, макрофаг, дендритную клетку, моноцит, эозинофил или эндотелиальную клетку.

57. Способ по любому из п.п.49-56, в котором поверхность находится в человеке.

58. Способ по п.57, в котором поверхность подвергают воздействию PRG4 посредством системного введения человеку.

59. Способ по п.58, в котором лиганд представляет собой гиалуронан (HA), комплекс гиалуронан-происходящий из сыворотки ассоциированный с гиалуронаном белок (HA-SHAP) или матриксную металлопротеиназу-9.

60. Способ уменьшения или ингибирования уровней провоспалительных цитокинов в крови, причем способ включает системное введение PRG4 в количестве, достаточном для уменьшения или ингибирования уровней провоспалительных цитокинов.

61. Способ по п.60, в котором провоспалительный цитокин выбран 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, фракталкинв, IFN- α 2, GRO, MCP-3, MDC, EPO, IL-13, IL-18, MCSF, MIP-3 α , MГ-CSF, IL-7, IL-5, G-CSF, Rantes, IL-17 α или IL-12p70.

62. Способ по п.60 или 61, в котором кровь представляет собой кровь индивидуума с сепсисом или риском сепсиса.

63. Способ по любому из п.п.60-62, в котором PRG4 вводят пациенту-человеку в количестве 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг.

64. Способ ингибирования транслокации NF- κ B в клетке в области, которая является не хрящевой, не оссальной, не костной и не суставной, и не является роговицей, мочевым пузырем или полостью рта, причем способ включает приведение клетки, содержащей NF- κ B, в контакт с PRG4, где PRG4 ингибирует активацию каскада передачи сигнала NF- κ B.

65. Способ по п.64, в котором PRG4 ингибирует рецептор TNF-

α или рецептор IL-1 на клеточной поверхности.

66. Способ по п.64, в котором клетка находится в человеке, когда ее приводят в контакт с PRG4.

67. Способ по любому из п.п.64-66, в котором PRG4 предоставляют в количестве, меньшем чем требуется для обеспечения пограничного смазывания.

68. Способ по п.67, в котором PRG4 вводят в количестве 0,1 мкг/кг-4000 мкг/кг.

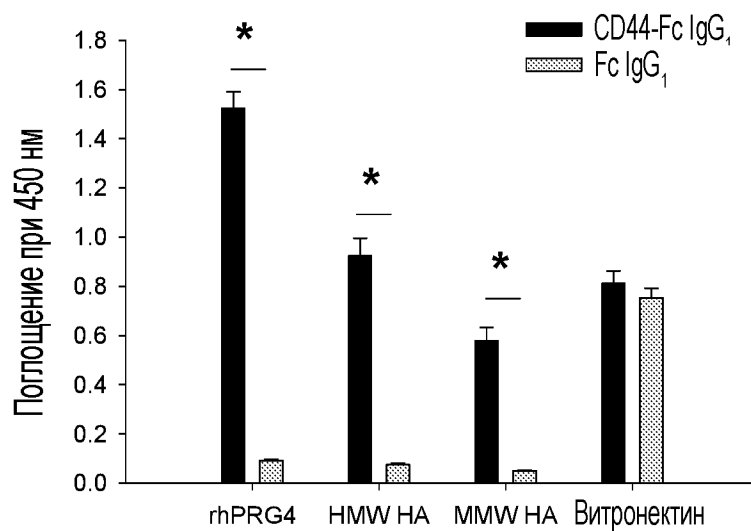
69. Способ по любому из п.п.64-68, в котором PRG4 приводят в контакт с клеткой посредством системного введения человеку.

70. Применение PRG4 для лечения воспалительного состояния.

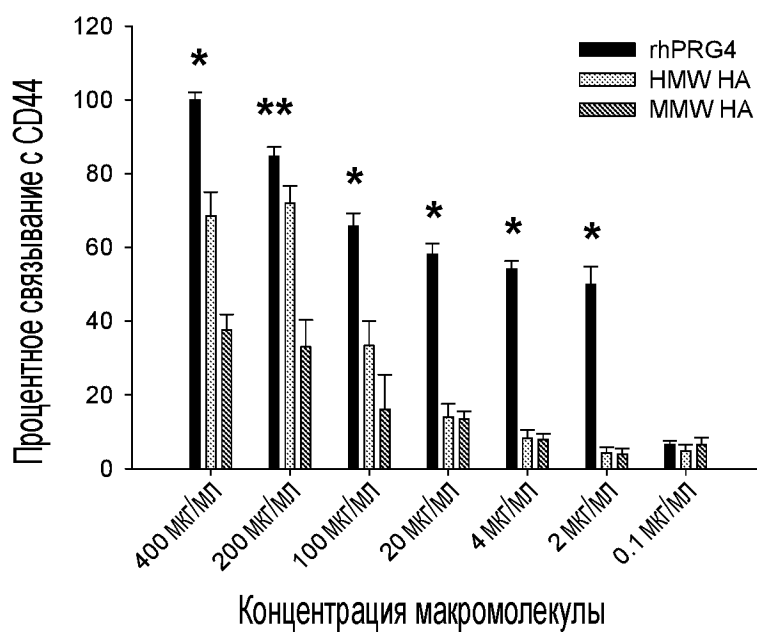
71. Применение PRG4 в качестве противовоспалительного средства.

72. Применение PRG4 для производства лекарственного средства для снижения или ингибирования воспаления или лечения воспалительного состояния.

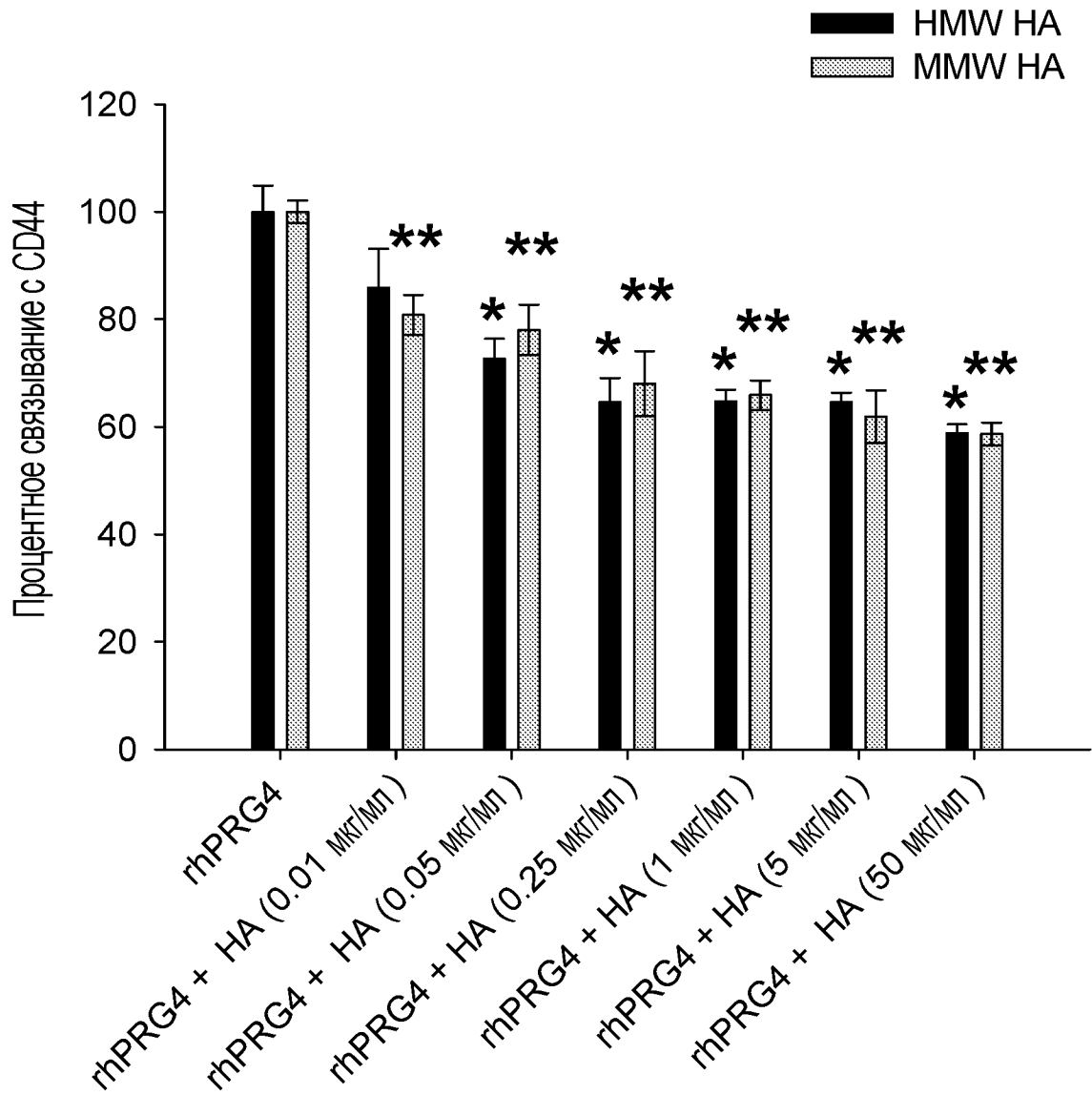
По доверенности



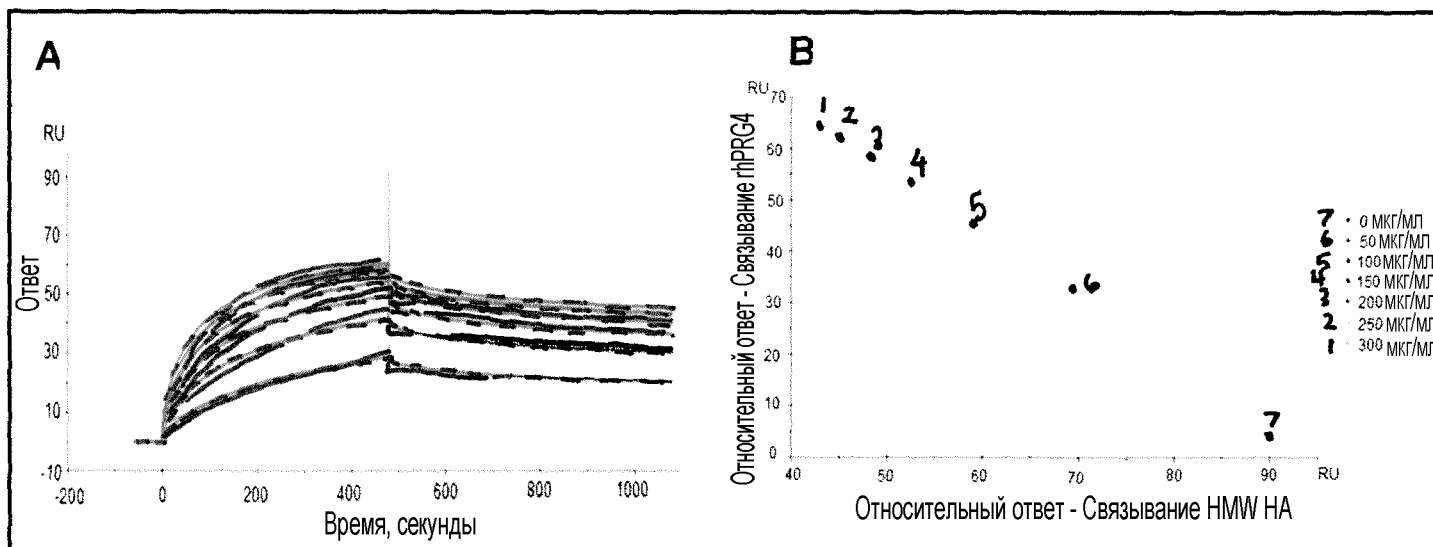
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

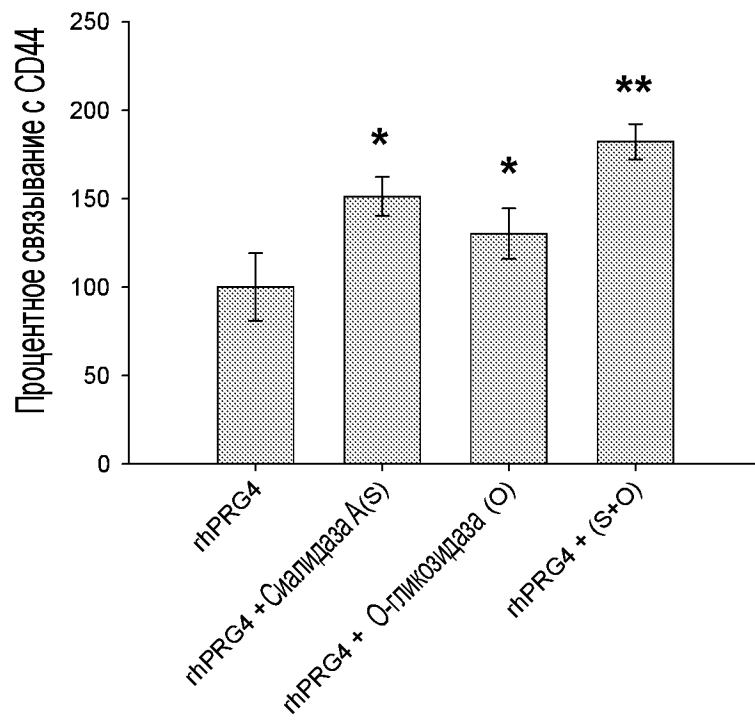


ФИГ. 1С

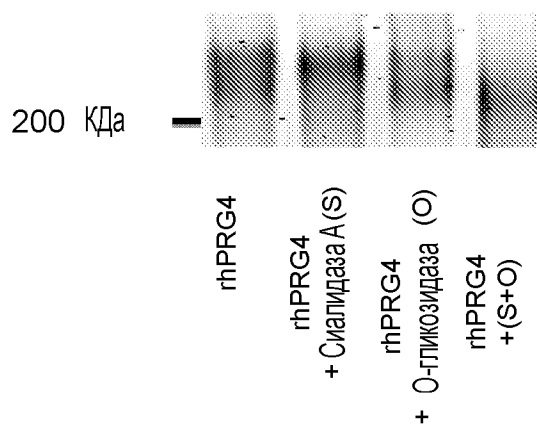


ФИГ. 2А

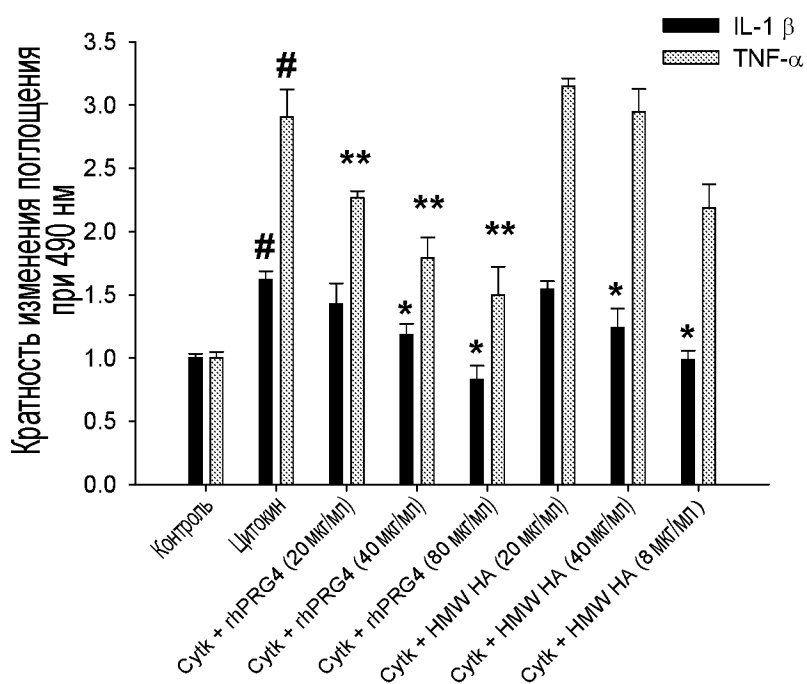
ФИГ. 2В



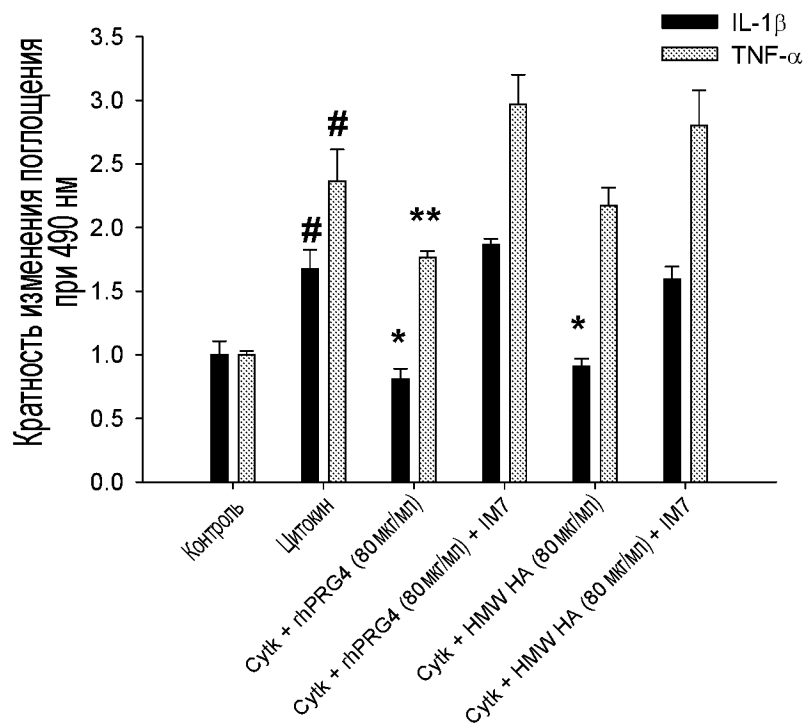
ФИГ. 3А



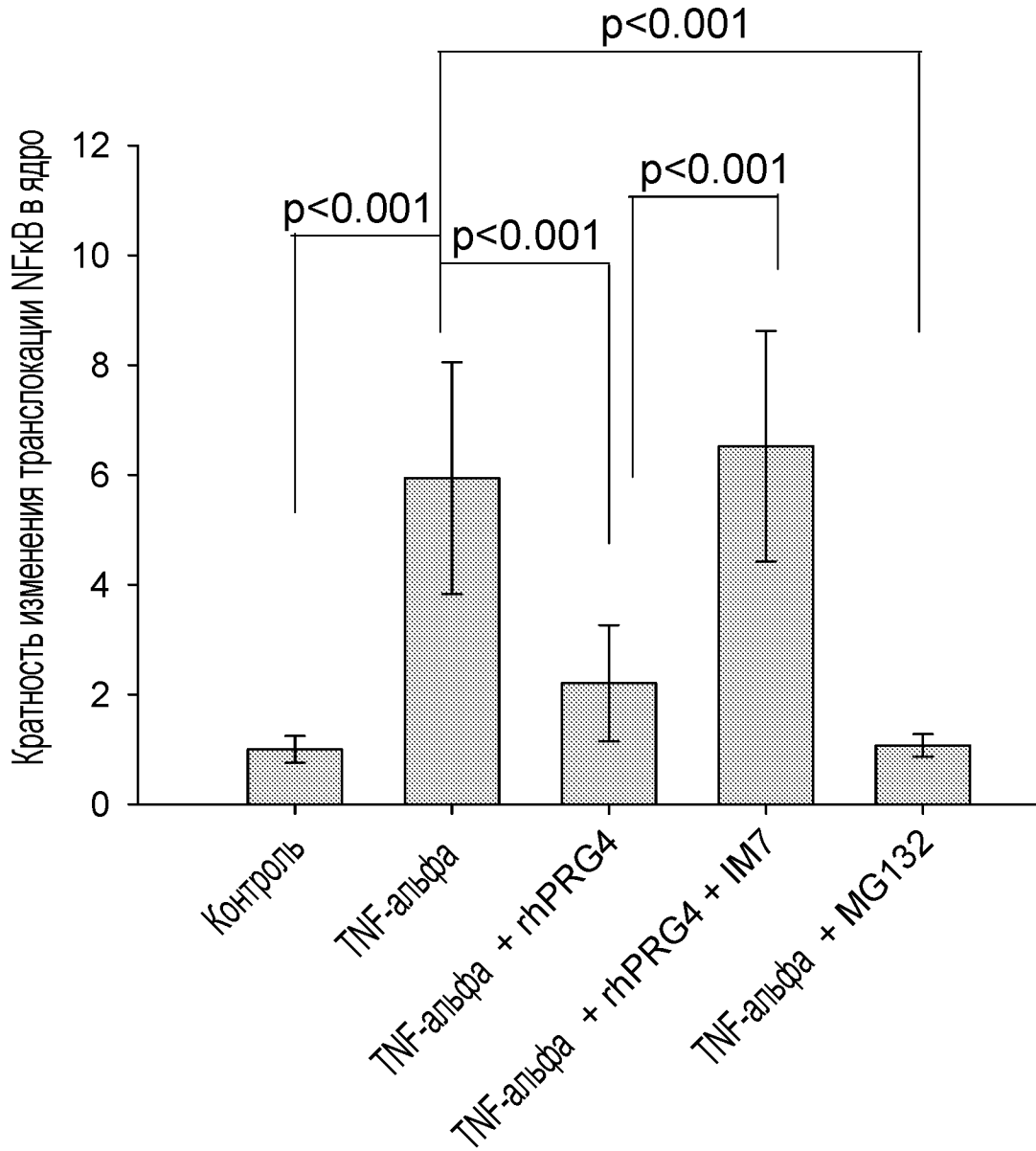
ФИГ. 3В



ФИГ. 4А



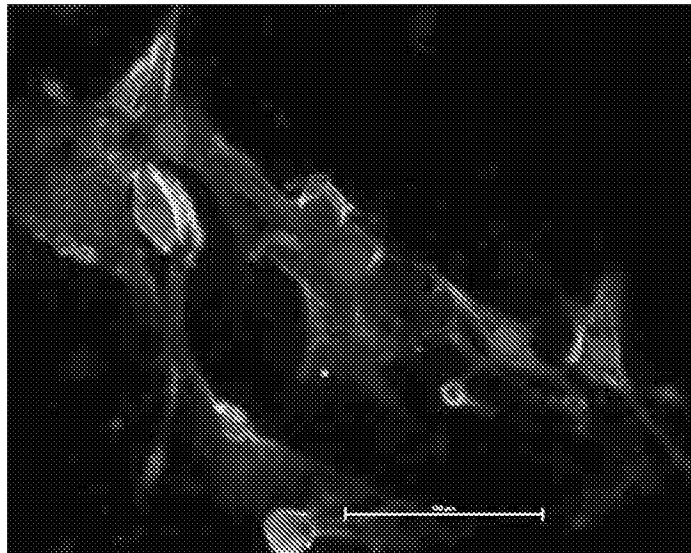
ФИГ. 4В



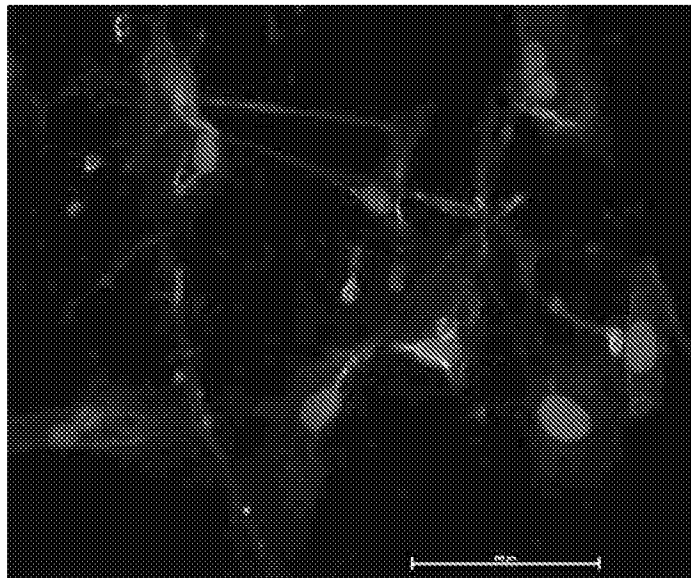
ФИГ. 4С

ФИГ. 5А

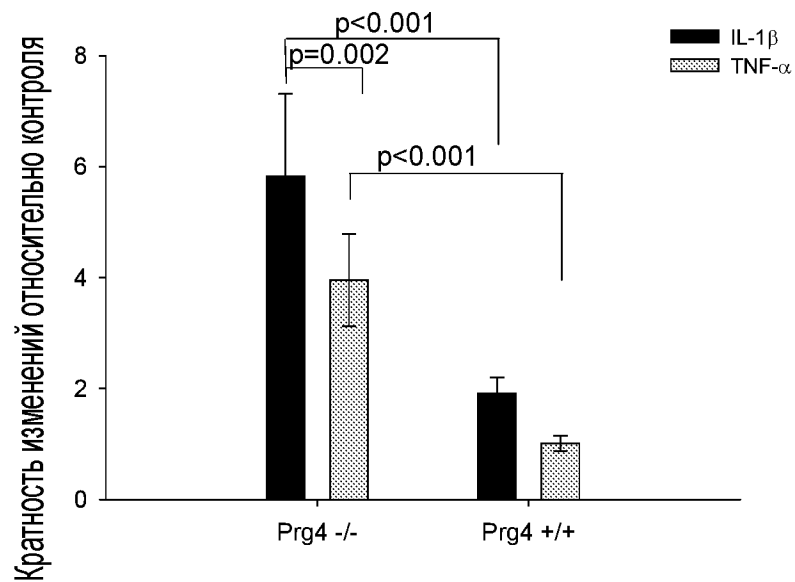
Prg4 -/- Синовиоциты



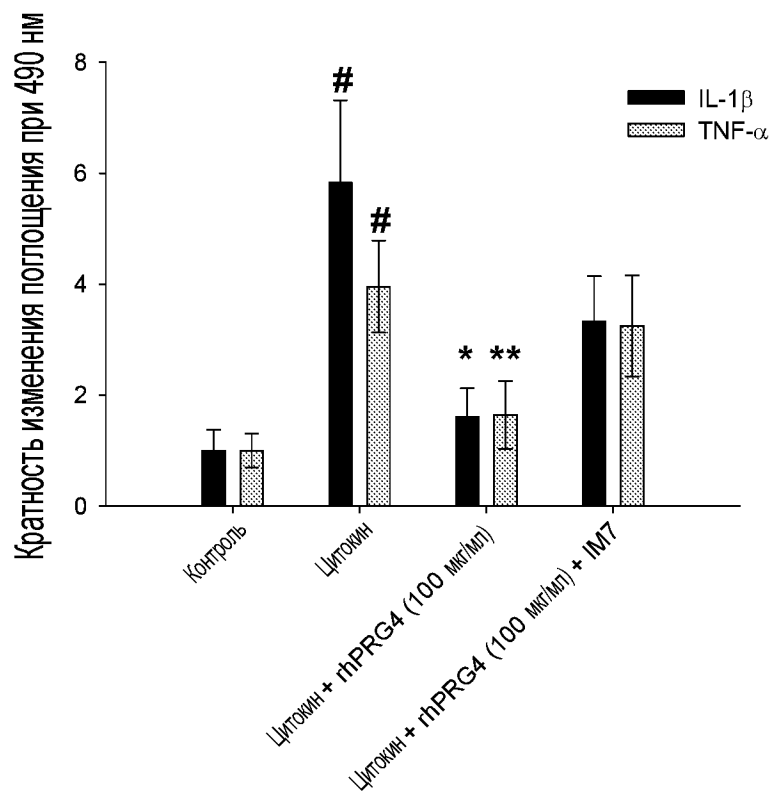
Prg4 +/- Синовиоциты



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С



ФИГ. 6

SEQ ID NO: 1, ДЛИНА: 1404, ОРГАНИЗМ: Homo sapiens, Номер доступа

UniProt №

MAWKTLPIYL LLLLSVFIQ QVSSQDLSSC AGRCGEGYSR DATCNCDYNC QHYMECCPDF
 KRVCТАELSC KGRCFESFER GRECDCAQC KKYDKCCPDY ESFCAEVHNP TSPPSSKKAP
 PPSGASQTIK STTKRSPKPP NKKKTKKVIE SEEITEEHSV SENQESSSSS SSSSSSSTIR
 KIKSSKNSAA NRELQKCLKV KDNKKNRTKK KPTPKPPVVD EAGSGLDNGD FKVTTPTDST
 TQHNKVSTSP KITТАKPINP RPSLPPNSDT SKETSLTVNK ETTVETKETT TTNKQSTDG
 KEKTSАKET QSIEKTSАKD LAPTSKVLAK PTPKAETTK GPALTPKEP TPPTPKEPAS
 TTPKEPTPTT IKSAPTPKE PAPTТTKSAP TTPKEPAPT TKEPAPTTPK EPAPTТTKEP
 APТТTKSAPT TPKEPAPTTP KKPAPTTPKE PAPTTPKEPT PTPKEPAPT TKEPAPTTPK
 EPAPTAPKKP APТTPKEPAP TTPKEPAPT TKEPSPTPK EPAPTТKSA PТТTKEPAPT
 TTKSAPTTPK EPSPTТTKEP APТTPKEPAP TTPKKPAPT PKEPAPTTPK EPAPTТKKP
 APТTPKEPAP TTPKETAPT PKKLTPTTPE KLAPTTPKEP APТTPEELAP TPPEEPTPTT
 PEEPAPTTPK AAAPNTPKEP APТTPKEPAP TTPKEPAPT PKETAPTTPK GTAPTTLKEP
 APТTPKKPAP KELAPTТTKE PTSTTCDKPA PТTPKGTAPT TPKEPAPTTP KEPAPTTPKG
 TAPTTLKEPA PТTPKKPAPK ELAPTТTKGP TSTTSDKPAP TTPKETAPT PKEPAPTTPK
 KPAPTTPETP PPTTSEVSTP TТTKЕPTTIH KSPDESTPEL SAEPTPKALE NSPKEPGVPT
 TKTPAATKPE MТTAKDKTT ERDLRTPET TТАAPKMTKE TATTTEKTTE SKITATТTQV
 TSTTTQDТTP FKITTLKTTT LAPKVТТTKK TITТTEIMNK PEETAKPKDR ATNSKATTPK
 PQKPTKAPKK PTSTKKPKTM PRVRKPKTTP TPRKMTSTMP ELNPTSRIAE AMLQTTTRPN
 QTPNSKLVEV NPKSEDAGGA EGETPHMLLR PHVFMPEVTP DMDYLPRVPN QGIIINPMLS
 DETNICNGKP VDGLTTLRNG TLVAFRGHYF WMLSPFSPPS PARRITEVWG IPSPIDTVFT
 RCNCEGKTFE FKDSQYWRFT NDIKDAGYPK PIFKGFGLT GQIVAALSTA KYKNWPESVY
 FFKRGGSIQQ YIYKQEPVQK CPGRRPALNY PVYGETTQVR RRRFERAIGP SQТHTIRIQY
 SPARLAYQDK GVLHNEVKVS ILWRGLPNVV TSAISLPNIR KPDGYDYAF SKDQYYNIDV
 PSRTARAИT RSGQTLKVVW YNCP

ФИГ. 7

SEQ ID NO: 2 ДЛИНА: 5041, TYPE: DNA, ОРГАНИЗМ: Homo sapiens,
Номер доступа GenBank № U70136.1:

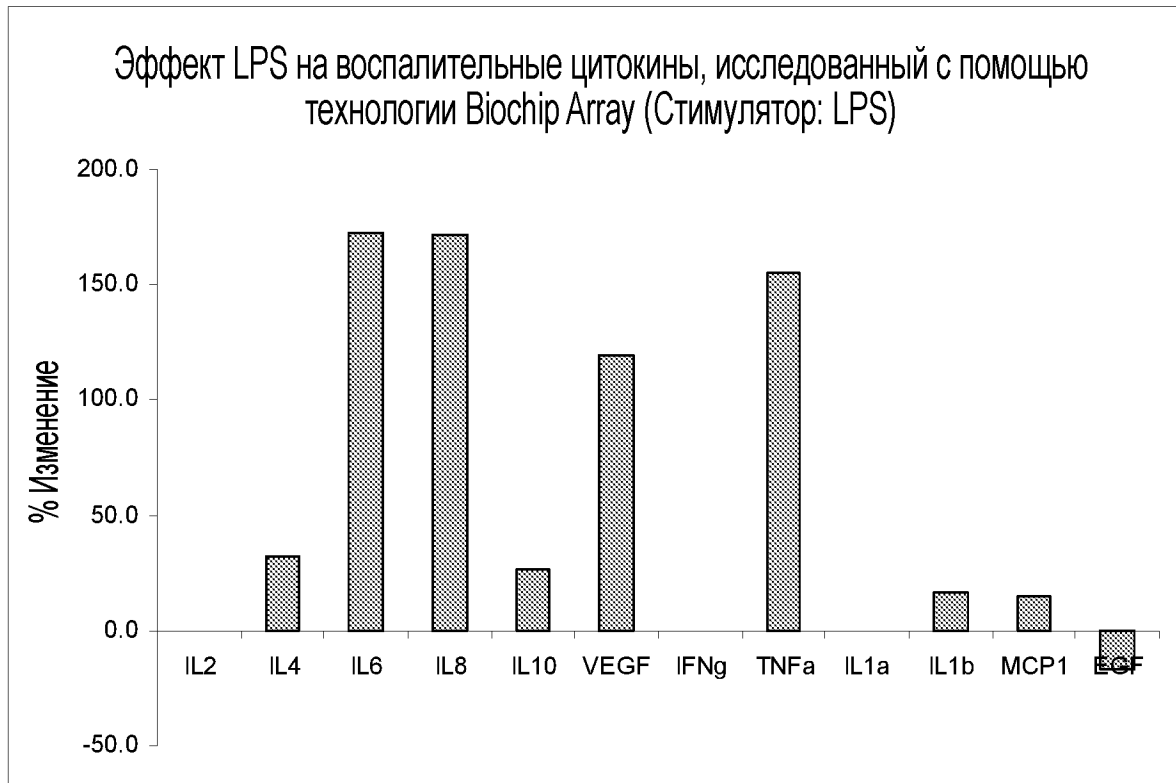
GCGGCCGCGACTATTCGGTACCTGAAAACAACGATGGCATGGAAAACACTTCCCATTTACCTGT
TGTTGCTGCTGTCTGTTTTTCGTGATTCAGCAAGTTTCATCTCAAGATTTATCAAGCTGTGCAGG
GAGATGTGGGGAAGGGTATTCTAGAGATGCCACCTGCAACTGTGATTATAACTGTCAACACTAC
ATGGAGTGCTGCCCTGATTTCAAGAGAGTCTGCACTGCGGAGCTTTCCTGTAAAGGCCGCTGCT
TTGAGTCCTTCGAGAGAGGGAGGGAGTGTGACTGCGACGCCCAATGTAAGAAGTATGACAAGTG
CTGTCCCGATTATGAGAGTTTCTGTGCAGAAGTGCATAATCCACATCACCACCATCTTCAAAG
AAAGCACCTCCACCTTCAGGAGCATCTCAAACCATCAAATCAACAACCAAACGTTACCCAAAC
CACCAAACAAGAAGAAGACTAAGAAAGTTATAGAATCAGAGGAAATAACAGAAGAACATTTCTGT
TTCTGAAAATCAAGAGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTTCTTCTTCAACAATTTGGAAA
ATCAAGTCTTCCAAAAATTCAGCTGCTAATAGAGAATTACAGAAGAAACTCAAAGTAAAAGATA
ACAAGAAGAACAGAACTAAAAAGAAACCTACCCCAAACCACCAGTTGTAGATGAAGCTGGAAG
TGGATTGGACAATGGTGACTTCAAGGTCACAACCTCCTGACACGTCTACCACCCAACACAATAAA
GTCAGCACATCTCCCAAGATCACAAACAGCAAAACCAATAAATCCCAGACCCAGTCTTCCACCTA
ATTTCTGATACATCTAAAGAGACGTCTTTGACAGTGAATAAAGAGACAACAGTTGAAACTAAAGA
AACTACTACAACAAATAAACAGACTTCAACTGATGGAAAAGAGAAGACTACTTCCGCTAAAGAG
ACACAAAGTATAGAGAAAACATCTGCTAAAGATTTAGCACCCACATCTAAAGTGCTGGCTAAAC
CTACACCCAAAGCTGAAACTACAACCAAAGGCCCTGCTCTCACCCTCCCAAGGAGCCACGCC
CACCCTCCCAAGGAGCCTGCATCTACCACACCCAAAGAGCCACACCTACCACCATCAAGTCT
GCACCCACCACCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCCTCCCAAGG
AGCCTGCACCCACCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCCTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCAC
CACCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCCTCCCAAGGAGCCTGCACCC
ACCACCCCAAGAAGCCTGCCCAACTACCCCAAGGAGCCTGCACCCACCCTCCCAAGGAGC
CTACACCCACCCTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCCTCCCAA
AGAGCCTGCACCCACTGCCCAAGAAGCCTGCCCAACTACCCCAAGGAGCCTGCACCCACC
ACTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGGAGCCTTACCACCCACTCCCAAGGAGCCTG
CACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCCTACCAAGGAGCCTGCACCCACCCTACCAAGTC

TGCACCCACCACTCCCAAGGAGCCTTCACCCACCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCACTCCC
AAGGAGCCTGCACCCACCACCCCCAAGAAGCCTGCCCCAACTACCCCCAAGGAGCCTGCACCCA
CCACTCCCAAGGAACCTGCACCCACCACCACCAAGAAGCCTGCACCCACCGCTCCCAAAGAGCC
TGCCCCAACTACCCCCAAGGAGACTGCACCCACCACCCCCAAGAAGCTCACGCCACCACCCCC
GAGAAGCTCGCACCCACCACCCCTGAGAAGCCCGCACCCACCACCCCTGAGGAGCTCGCACCCA
CCACCCCTGAGGAGCCACACCCACCACCCCTGAGGAGCCTGCTCCCACCACTCCCAAGGCAGC
GGCTCCCAACACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCT
AAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCTAAAGGGACTGCTCCAA
CTACCCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCAAGGAGCTTGCACCCAC
CACCACCAAGGAGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCCGCTCCAACCTACCCCTAAGGGGACT
GCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTA
AGGGGACTGCTCCAACCTACCCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCAA
GGAGCTTGCACCCACCACCACCAAGGGGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCTGCTCCAACCT
ACACCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCAAGGAGCCTGCACCCACTACCCCAAGAAGCCTG
CTCCAACCTACTCCTGAGACACCTCCTCCAACCACTTCAGAGGTCTCTACTCCAACCTACCACCAA
GGAGCCTACCCTATCCACAAAAGCCCTGATGAATCAACTCCTGAGCTTTCTGCAGAACCACACA
CCAAAAGCTCTTGAAAACAGTCCCAAGGAACCTGGTGTACCTACAACCTAAGACTCCTGCAGCGA
CTAAACCTGAAATGACTACAACAGCTAAAGACAAGACAACAGAAAGAGACTTACGTACTACCC
TGAAACTACAACCTGCTGCACCTAAGATGACAAAAGAGACAGCAACTACAACAGAAAAAACTACC
GAATCCAAAATAACAGCTACAACCACACAAGTAACATCTACCACAACCTCAAGATACCACACCAT
TCAAAATTACTACTCTTAAAACAACCTACTCTTGCACCCAAAGTAACTACAACAAAAAAGACAAT
TACTACCACTGAGATTATGAACAAAACCTGAAGAAACAGCTAAACCAAAAGACAGAGCTACTAAT
TCTAAAGCGACAACCTCCTAAACCTCAAAGCCAACCAAAGCACCCAAAAAACCCTTCTACCA
AAAAGCCAAAAACAATGCCTAGAGTGAGAAAACCAAAGACGACACCAACTCCCCGCAAGATGAC
ATCAACAATGCCAGAATTGAACCCTACCTCAAGAATAGCAGAAGCCATGCTCCAAACCACCACC
AGACCTAACCAAACCTCCAACTCCAACTAGTTGAAGTAAATCCAAAGAGTGAAGATGCAGGTG
GTGCTGAAGGAGAAACACCTCATATGCTTCTCAGGCCCCATGTGTTTCATGCCTGAAGTTACTCC
CGACATGGATTACTTACCGAGAGTACCCAATCAAGGCATTATCATCAATCCCATGCTTTCCGAT
GAGACCAATATATGCAATGGTAAGCCAGTAGATGGACTGACTACTTTGCGCAATGGGACATTAG
TTGCATTCCGAGGTCATTATTTCTGGATGCTAAGTCCATTCAGTCCACCATCTCCAGCTCGCAG

AATTACTGAAGTTTGGGGTATTCCTTCCCCATTGATACTGTTTTTACTAGGTGCAACTGTGAA
GGAAAACTTTCTTCTTTAAGGATTCTCAGTACTGGCGTTTTACCAATGATATAAAAAGATGCAG
GGTACCCCAAACCAATTTTCAAAGGATTTGGAGGACTAACTGGACAAATAGTGGCAGCGCTTTC
AACAGCTAAATATAAGAAGCTGGCCTGAATCTGTGTATTTTTTCAAGAGAGGTGGCAGCATTTCAG
CAGTATATTTATAAACAGGAACCTGTACAGAAGTGCCCTGGAAGAAGGCCTGCTCTAAATTATC
CAGTGTATGGAGAAATGACACAGGTTAGGAGACGTCGCTTTGAACGTGCTATAGGACCTTCTCA
AACACACACCATCAGAATTCAATATTCACCTGCCAGACTGGCTTATCAAGACAAAGGTGTCCTT
CATAATGAAGTTAAAGTGAGTATACTGTGGAGAGGACTTCCAAATGTGGTTACCTCAGCTATAT
CACTGCCCAACATCAGAAAACCTGACGGCTATGATTACTATGCCTTTTCTAAAGATCAATACTA
TAACATTGATGTGCCTAGTAGAACAGCAAGAGCAATTACTIONCGTTCTGGGCAGACCTTATCC
AAAGTCTGGTACAACCTGTCCTTAGACTGATGAGCAAAGGAGGAGTCAACTAATGAAGAAATGAA
TAATAAATTTTGACACTGAAAAACATTTTATTAATAAAGAATATTGACATGAGTATAACCAGTTT
ATATATAAAAATGTTTTTAACTTGACAATCATTACACTAAAACAGATTTGATAATCTTATTCA
CAGTTGTTATTGTTTACAGACCATTTAATTAATATTTCCCTCTGTTTATTCCCTCCTCCTCCCTCCC
ATTGCATGGCTCACACCTGTAAAAGAAAAAGAATCAAATTGAATATATCTTTTAAGAATTCAA
AACTAGTGTATTCACCTACCCTAGTTCATTATAAAAAATATCTAGGCATTGTGGATATAAAACT
GTTGGGTATTCTACAACCTCAATGGAAATTATTACAAGCAGATTAATCCCTCTTTTTTGTGACAC
AAGTACAATCTAAAAGTTATATTGGAAAACATGGAAATATTAATAATTTTACACTTTTACTAGCT
AAAACATAATCACAAAGCTTTATCGTGTTGTATAAAAAAATTAACAATATAATGGCAATAGGTA
GAGATAACAACAATGAATATAACACTATAACACTTCATATTTTCCAAATCTTAATTTGGATTTA
AGGAAGAAATCAATAAATATAAAATATAAGCACATATTTATTATATATCTAAGGTATACAAATC
TGTCTACATGAAGTTTACAGATTGGTAAATATCACCTGCTCAACATGTAATTATTTAATAAAAC
TTTGGAACATTAATAAATAAATTGGAGGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

	Солевой раствор	LPS	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	1.08	1.4	32.1
IL6	11	30	172.7
IL8	208	560	171.8
IL10	0.38	0.48	26.3
VEGF	21	48	119.0
IFNg	0.3	0.3	0.0
TNFa	128	327	155.5
IL1a	0.5	0.5	0.0
IL1b	1.48	1.7	18.4
MCP1	79	91	15.2
EGF	4.1	3.4	-17.1

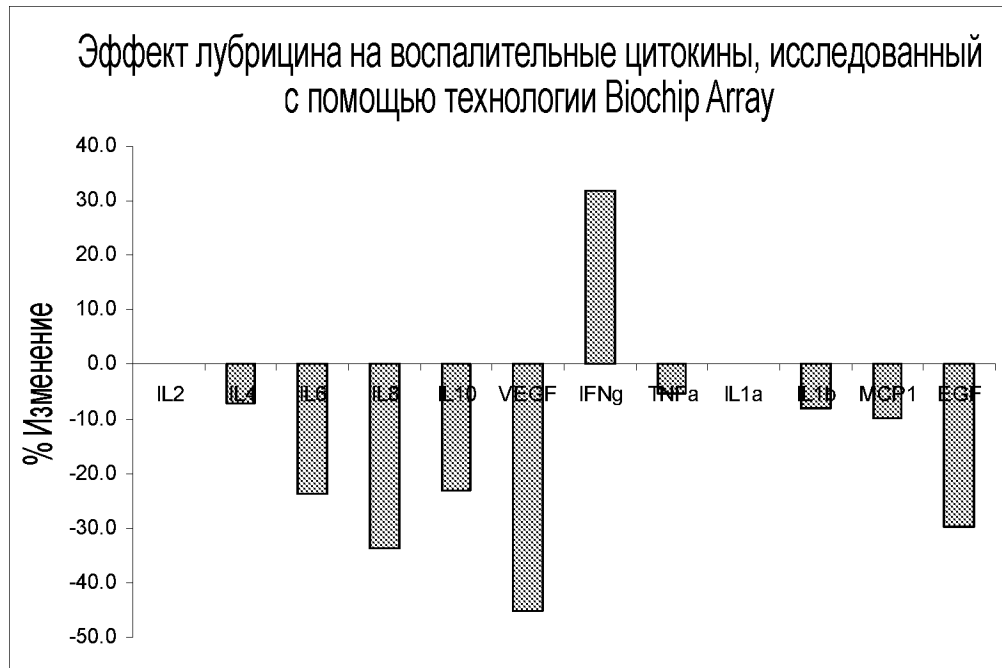
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

	Солевой раствор	Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	0.99	0.92	-7.1
IL6	89	68	-23.6
IL8	392	260	-33.7
IL10	2.78	2.14	-23.0
VEGF	12.69	6.85	-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

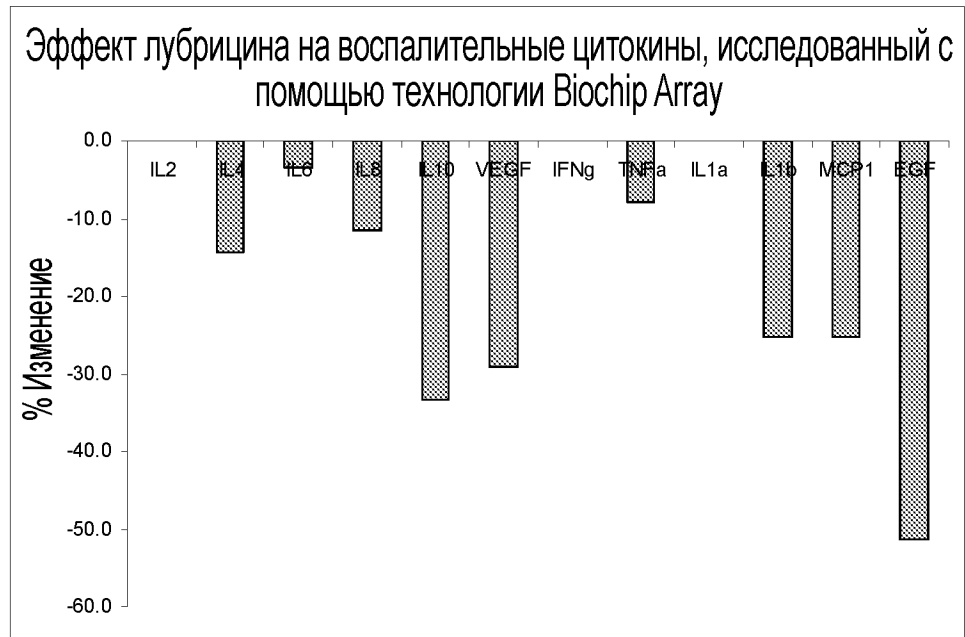
ФИГ. 9А



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
IFNg	0.52	0.52	0.0
TNFa	327	301	-8.0
IL1a	0.82	0.82	0.0
IL1b	1.82	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	0.96	0.96	2.1
IL6	95	68	-26.4
IL8	400	235	-41.3
IL10	10	9	-10.0
VEGF	65	41	-36.9
IFNγ	1.4	0	-100.0
TNFα	663	34	-96.1
IL1α	0.33	0.41	24.2
IL1β	34	16	-47.1
MCP1	250	250	0.0
EGF	19	11	-42.1

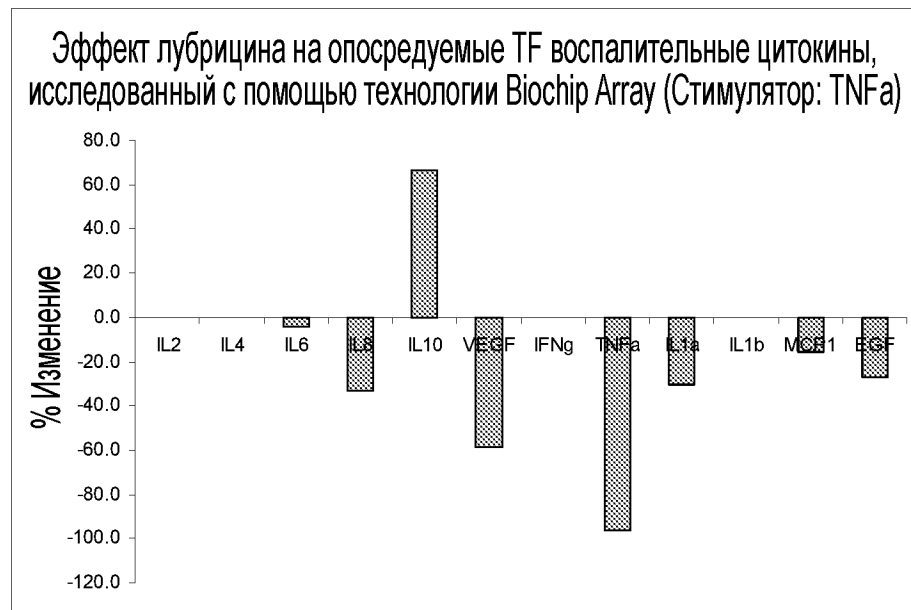
ФИГ. 11А



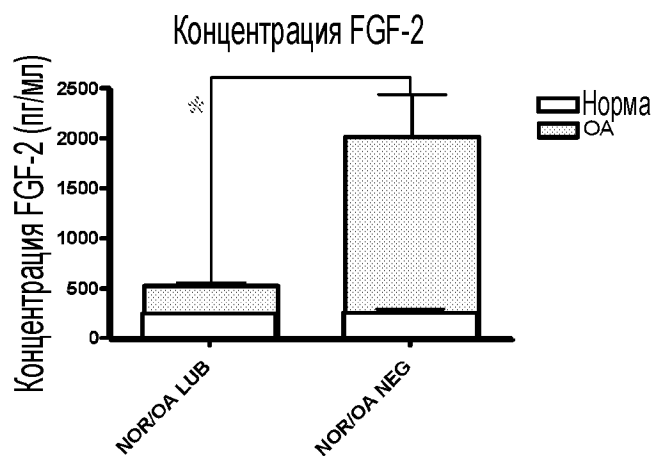
ФИГ. 11В

	TF	TF/ Лубрицин	% Изменение
IL2	0	0	0.0
IL4	0.92	0.92	0.0
IL6	71	68	-4.2
IL8	350	233	-33.4
IL10	1.26	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	7.16	-0.4
MCP1	199	168	-15.6
EGF	2.74	1.99	-27.4

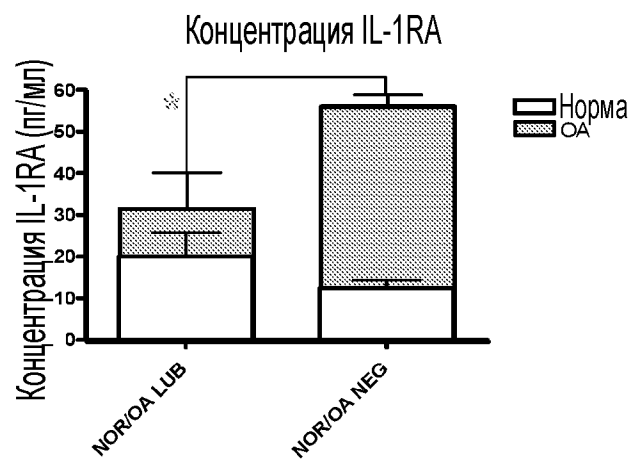
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В

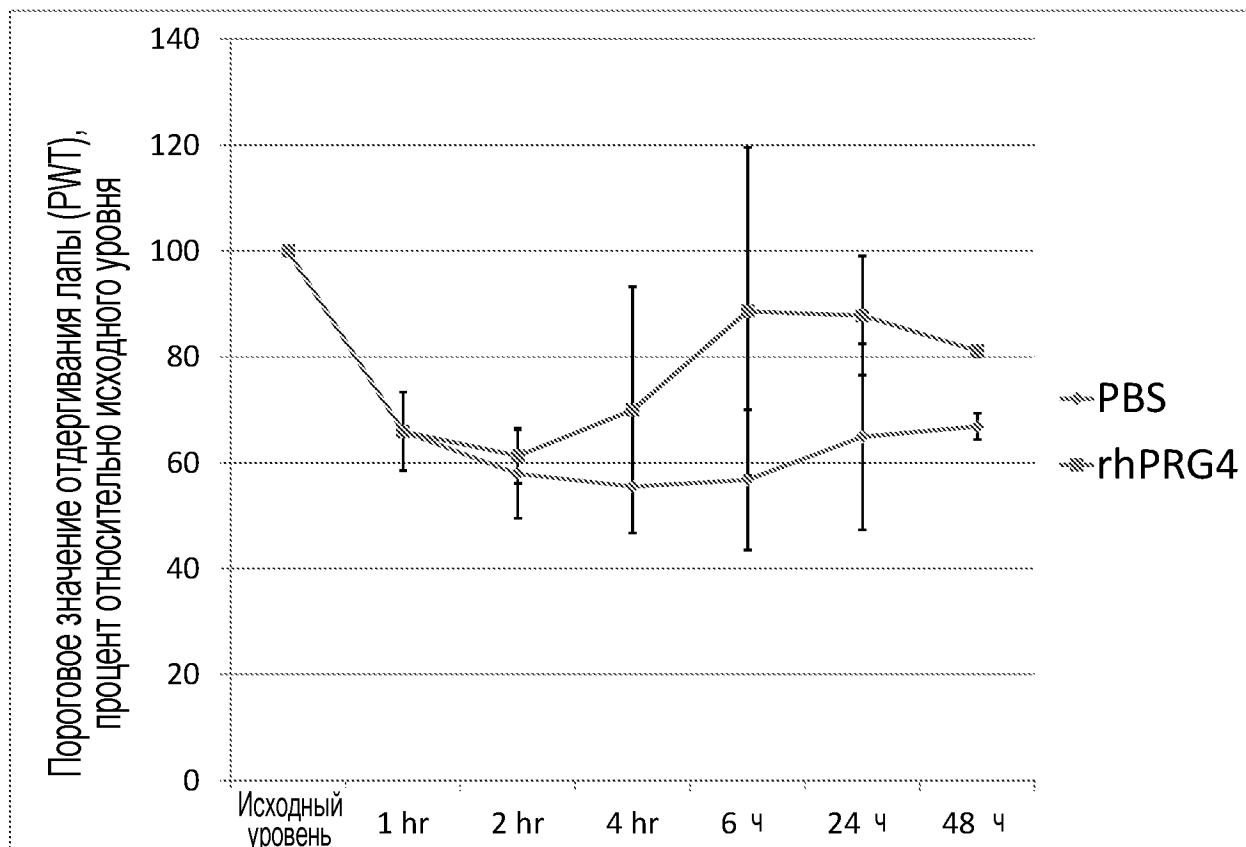


ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

ФИГ. 15



Фиг.15. 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 час 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.