(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 808 199**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2016 PCT/US2016/014952**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16123123**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2016 E 16704975 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3250221**

(54) Título: **Uso de PRG4 como un agente antiinflamatorio**

(30) Prioridad:

26.01.2015 US 201562107799 P
30.12.2015 US 201562273059 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2021

(73) Titular/es:

LUBRIS, LLC (50.0%)
111 Speen Street, Suite 303
Framingham, MA 01701, US y
RHODE ISLAND HOSPITAL (50.0%)

(72) Inventor/es:

JAY, GREGORY, D.;
SULLIVAN, BENJAMIN, D.;
SCHMIDT, TANNIN, AVERY;
ELSAID, KHALED;
TRUITT, EDWARD, R.;
KRAWETZ, ROMAN;
SZMYDYNGER-CHODOBSKA, JOANNA;
CHODOBSKI, ADAM y
FAREED, JAWED

(74) Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de PRG4 como un agente antiinflamatorio

Campo de la invención

Esta invención se refiere a nuevos usos de la glicoproteína humana PRG4 o lubricina.

Antecedentes

El gen del proteoglicano 4 (PRG4) codifica el factor de estimulación de megacariocitos (MSF), así como también la variante altamente glicosilada que empalma de manera diferente y glucoformas de la "proteína de la zona superficial", conocida, además, como lubricina. La proteína de la zona superficial se localizó primero en la superficie de cartílago de explante de la zona superficial y se identificó en medio acondicionado. La lubricina se aisló por primera vez del líquido sinovial y demostró una capacidad lubricante *in vitro* similar al líquido sinovial en una interfaz cartílago-vidrio y en una interfaz látex-vidrio. Más tarde se identificó como un producto de fibroblastos sinoviales, y se descubrió que su capacidad de lubricación dependía de los enlaces O β (1-3) oligosacáridos Gal-GalNAc dentro de un gran dominio similar a mucina de 940 aminoácidos codificados por el exón 6. Las moléculas de lubricina están glicosiladas de manera diferencial y se han informado varias variantes de empalme que ocurren naturalmente. Se denominan colectivamente en la presente descripción como PRG4. Se ha demostrado que PRG4 está presente dentro del cuerpo en la superficie de la membrana sinovial, tendón, cartílago articular como el menisco y en la película protectora del ojo, entre otros sitios, y juega un papel importante en la lubricación articular y en la homeostasis sinovial.

Antes de las invenciones de los solicitantes, PRG4 se había apreciado como una proteína con propiedades solo mecánicas, que proporciona funcionalidades mecánicas tales como lubricar articulaciones, tendones, cartílagos y actúa como una barrera mecánica para inhibir las interacciones intercelulares. Sin embargo, como se muestra en la presente descripción, los solicitantes han descubierto que la lubricina tiene propiedades que se extienden más allá de su capacidad para proporcionar lubricación límite y anti-adhesión. En particular, los solicitantes han determinado que PRG4 tiene propiedades antiinflamatorias debido a su capacidad de actuar como ligando o molécula de señalización, que participa en las interacciones del receptor ligando para modular, por ejemplo, la activación de CD44, la translocación de NF-κB, y la inflamación mediada por citocinas.

Resumen de la invención

La presente invención explota las propiedades antiinflamatorias hasta ahora desconocidas de PRG4, conocida, además, como lubricina. En consecuencia, la invención proporciona PRG4 para su uso en un método para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria en un paciente con lesión cerebral como se define en las reivindicaciones adjuntas a tal efecto. Subyacente al descubrimiento de las propiedades antiinflamatorias de PRG4 está la comprensión de varios mecanismos putativos mediante los cuales PRG4 logra su efecto antiinflamatorio. Los solicitantes descubrieron estos mecanismos y determinaron que PRG4 se une a los receptores CD44, lo que le permite actuar como un antagonista del receptor CD44. Como resultado, PRG4 es capaz de regular negativamente las respuestas proinflamatorias mediadas por la señalización del receptor CD44. La capacidad de PRG4 de afectar la señalización de CD44 tiene, además, el efecto de regular negativamente la translocación de NF-κB. Además, se ha demostrado que la administración de PRG4 inhibe la producción de varias citocinas proinflamatorias, así como modula las respuestas celulares y la proliferación debido a la inducción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF-a); una característica exclusiva de PRG4 y no de otros lubricantes como el ácido hialurónico de alto peso molecular. Por lo tanto, PRG4 puede usarse de varias maneras nuevas en contextos terapéuticos y profilácticos para efectuar una acción antiinflamatoria a través de su efecto sobre las vías de señalización involucradas en la producción de una respuesta inflamatoria.

PRG4 puede administrarse sistémicamente al paciente. Por ejemplo, la administración puede ser intravenosa, por inhalación, intramuscular, subcutánea, oral, rectal, bucal o sublingual. PRG4 puede administrarse, además, localmente al paciente, por ejemplo, administrarse al cerebro por vía tópica durante la cirugía o por inyección.

En una modalidad adicional, el PRG4 administrado es PRG4 humano recombinante. En otra modalidad, el PRG4 tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1 menos la secuencia de señal. En una modalidad, PRG4 se administra en una cantidad insuficiente para proporcionar lubricación límite en el paciente. En otra modalidad, PRG4 se administra en una cantidad que varía de 0,1 µg/kg - 4000 µg/kg o como recubrimiento sobre una superficie de tejido aplicada a partir de una solución de PRG4 que comprende, por ejemplo, una concentración de PRG4 entre 10 µg/mL hasta aproximadamente 2 mg/mL.

En una modalidad, la reducción o inhibición de la respuesta inflamatoria puede medirse por el nivel de producción de una citocina proinflamatoria en el paciente. Por ejemplo, en una modalidad, la citocina proinflamatoria se selecciona del grupo que consiste en IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17α, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF-α, TNF-β (linfotoxina-α), linfotoxina-β, CXC31L (Fractalquina), 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, MIP3α, MG-CSF, y GCSF.

La administración de PRG4 une un receptor CD44 en una célula del paciente, reduce o inhibe la producción de una citocina proinflamatoria en el paciente, y/o reduce o inhibe la translocación de NF-κB en una célula del paciente y, por lo tanto, reduce o inhibe la respuesta inflamatoria en el paciente.

La administración de PRG4 puede reducir o inhibir una citocina proinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, IFN-γ, TNF-α, IL-1α, IL-1β, MCP-1, EGF, FGF-2, Fractalquina, IFN-α2, GRO, MCP-3, MDC, EPO, IL-13, IL-18, MCSF, MIP-3α, MG-CSF, IL-7, IL-5, G-CSF, Rantes, IL-17α, o IL-12p70.

El PRG4, por ejemplo rhPRG4, puede administrarse a un sujeto humano en una cantidad que varía de 0,1 µg/kg - 4000 µg/kg. El PRG4, por ejemplo, rhPRG4, puede administrarse en una cantidad de 0,1 µg/mL a 30 mg/mL en pequeños volúmenes de 1-100 µL por dosis. El PRG4 puede administrarse en una cantidad de 10 µg/mL a 4 mg/ml en volúmenes de 100 µL - 4 L por dosis, por ejemplo como un enema.

Como se describe en la presente descripción, exponer una superficie a PRG4, por ejemplo, rhPRG4, antagoniza un ligando proinflamatorio de CD44. En una modalidad, el ligando es hialuronano (HA), un complejo proteico asociado a hialuronano derivado de suero de hialuronano (HA-SHAP), o una metaloproteinasa de matriz (por ejemplo, MMP-9). En otra modalidad, el ligando es hemopexina, EMMPRIN, somatomedina-B, osteopontina, OKT3 o una proteína relacionada con el complemento tal como C3a, CD3, CD46.

Como se describe en la presente descripción, PRG4 puede reducir o inhibir los niveles de citocinas proinflamatorias en la sangre, por ejemplo, en un sujeto humano. PRG4 puede administrarse sistémicamente en una cantidad suficiente para reducir o inhibir los niveles de citocinas proinflamatorias. Las citocinas proinflamatorias ilustrativas incluyen 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, fractalquina, IFN-α2, GRO, MCP-3, MDC, EPO, IL-13, IL-18, MCSF, MIP-3α, MG-CSF, IL-7, IL-5, G-CSF, Rantes, IL-17α, o IL-12p70.

PRG4 puede inhibir la translocación de NF-κB en una célula. Poner en contacto una célula que contiene NF-κB con PRG4, en donde PRG4 se une a un receptor de superficie celular, puede inhibir la activación de la vía de señalización de NF-κB. PRG4 puede inhibir un receptor de TNF-α o un receptor de IL-1 en la superficie celular.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-C son gráficos de barras que presentan datos que demuestran la unión del proteoglicano humano recombinante 4 (rhPRG4), ácido hialurónico de alto peso molecular (HMW HA) y ácido hialurónico de peso molecular medio (MMW HA) al receptor CD44 humano recombinante detectado mediante TMB-ELISA a 450 nm. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes con pocillos por triplicado por grupo. La Figura 1A representa la unión de rhPRG4, HMW HA, MMW HA y vitronectina a CD44-IgG$_1$Fc y mediante el uso de IgG1 Fc. El asterisco (*) indica que la absorbancia a 450 nm en los pocillos CD44-IgG1 Fc fue estadísticamente significativamente mayor ($p<0,001$) que en los pocillos IgG1 Fc para rhPRG4, HMW HA y MMW HA. La Figura 1B muestra la unión a CD44 dependiente de la concentración de rhPRG4, HMW HA y MMW HA. La unión de CD44 a rhPRG4 fue significativamente mayor que a HMW HA o MMW HA ($p<0,001$). Los asteriscos dobles (**) indican que la unión de CD44 a rhPRG4 fue significativamente mayor que a MMW HA ($p<0,001$). La Figura 1C representa la competencia entre rhPRG4 (5 µg/mL) y HMW HA o MMW HA (0,01 µg/mL hasta 50 µg/mL) al unirse a CD44 recubierto en placas ELISA de 96 pocillos. El asterisco (*) indica que el porcentaje de unión a CD44 en los pocillos HMW HA+rhPRG4 fue significativamente menor que el de los pocillos rhPRG4 ($p<0,05$); (**) indica que el porcentaje de unión a CD44 en los pocillos MMW HA+rhPRG4 fue significativamente menor que el de los pocillos rhPRG4 ($p<0,05$).

Las Figuras 2A-B representan la unión del proteoglicano humano recombinante 4 (rhPRG4) al CD44 recombinante y la competencia entre rhPRG4 y ácido hialurónico de alto peso molecular (HMW HA) en la unión a CD44 mediante el uso de resonancia superficial de plasmón. La Figura 2A es un sensograma que representa la asociación y la disociación dependientes de la concentración de rhPRG4 (300 µg/mL a 50 µg/mL) a CD44-IgG$_1$Fc inmovilizado. Las curvas de línea discontinua representan las curvas de unión de rhPRG4 a la proteína quimérica CD44 y las líneas negras representan el modelo de unión 1:1 ajustado. La Figura 2B es un gráfico que muestra la respuesta relativa de la unión HMW HA frente a la respuesta relativa de la unión rhPRG4. Competencia entre rhPRG4 y HMW HA en la unión a CD44-IgG$_1$Fc inmovilizado. Se inyectó rhPRG4 a 300 (1), 250 (2), 200 (3), 150 (4), 100 (5), 50 (6) y 0 (7) µg/mL. Tras la disociación de rhPRG4, se inyectó HMW HA a 50 µg/mL. A medida que aumentaba la concentración de rhPRG4, disminuía la unión posterior de HMW HA a CD44.

Las Figuras 3A-B muestran el impacto de la digestión con sialidasa-A y O-glucosidasa del proteoglicano humano recombinante 4 (rhPRG4) sobre la unión de rhPRG4 a CD44. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes con pocillos por triplicado por grupo. La Figura 3A es un gráfico de barras que representa la unión de rhPRG4, rhPRG4 digerido con sialidasa-A, rhPRG4 digerido con O-glucosidasa y rhPRG4 digerido con sialidasa-A + O-glucosidasa a CD44. Los valores de absorbancia a 450 nm en diferentes grupos se normalizaron a los valores de

absorbancia en el grupo rhPRG4 no digerido. El (*) indica que la unión a CD44 del rhPRG4 digerido con sialidasa A y digerido con O-glucosidasa fue significativamente mayor en comparación con el rhPRG4 no digerido *(p<0,01).* (**) indica que la unión a CD44 del rhPRG4 digerido con sialidasa-A + O-glucosidasa fue significativamente mayor en comparación con el rhPRG4 digerido con sialidasa-A, con O-glucosidasa y sin digerir *(p<0,01).* La Figura 3B es una fotografía de una SDS-PAGE de rhPRG4, rhPRG4 digerido con sialidasa-A, rhPRG4 digerido con O-glucosidasa y rhPRG4 digerido con una combinación de sialidasa-A y O-glucosidasa. El gel se tiñó durante toda la noche con azul Commassie. La digestión con sialidasa-A y O-glucosidasa dio como resultado la reducción del peso molecular evidente de rhPRG4.

Las Figuras 4A-B muestran el impacto del tratamiento con proteoglicano humano recombinante 4 (rhPRG4) y ácido hialurónico de alto peso molecular (HMW HA) sobre la proliferación inducida por citocinas de sinoviocitos similares a fibroblastos en la artritis reumatoide (RA-FLS). Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con pocillos por triplicado por tratamiento. La Figura 4A es un gráfico de barras que representa la inhibición de la proliferación de RA-FLS inducida por citocinas por rhPRG4 y HMW HA. (#) indica que la RA-FLS estimulada por citocinas tenía una absorbancia significativamente mayor (p<0,001) que las células no tratadas. (*) indica que el tratamiento de IL-1β RA-FLS estimuladas con rhPRG4 (40 y 80 µg/mL) o HMW HA (40 y 80 µg/mL) redujo significativamente (p<0,05) la proliferación celular en comparación con las células IL-1β estimuladas no tratadas. (**) indica que el tratamiento con rhPRG4 (20, 40 y 80 µg/mL) redujo significativamente (p<0,05) la proliferación celular en comparación con células estimuladas TNF-α no tratadas. La Figura 4B es un gráfico de barras que representa la inhibición de la proliferación de RA-FLS inducida por citocinas mediante rhPRG4 y HMW HA en presencia y ausencia de IM7, un anticuerpo específico de CD44. (#) indica que la RA-FLS estimulada por citocinas tenía una absorbancia significativamente mayor (p<0,001) que las células no tratadas. (*) indica que el tratamiento con rhPRG4 o HMW HA tuvo una proliferación celular significativamente menor en comparación con la IL-1β no tratada o tratada con (rhPRG4 o HMW HA) + IM7 (p<0,05). (**) indica que el tratamiento con rhPRG4 tuvo una proliferación celular significativamente menor (p<0,05) en comparación con el TNF-α no tratado o tratado con rhPRG4 + IM7 (p<0,05), un resultado que HMW HA no replicó. La Figura 4C es un gráfico de barras que representa la inhibición de rhPRG4 de la translocación nuclear de NF-κB inducida por TNF-α en RA-FLS. La translocación nuclear de NF-κB en el grupo TNF-α+rhPRG4 fue significativamente más baja que en el TNF-α solo o en los grupos TNF-α+rhPRG4+IM7 (p<0,001). El tratamiento con rhPRG4 o con el inhibidor de translocación de NFκB MG132 redujo significativamente la translocación nuclear de NFκB en comparación con los RA-FLS tratados con TNF-α (p<0,001).

Las Figuras 5A-C representan el impacto de las citocinas proinflamatorias sobre la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ y el efecto de rhPRG4. La Figura 5A muestra micrografías de fluorescencia de sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ inmunocitoteñidos mediante el uso de anticuerpos anti-CD44 (IM7) (Green) y DAPI (azul). La fluorescencia verde potenciada en los sinoviocitos Prg4-/- indica una localización de CD44 aumentada en comparación con los sinoviocitos Prg4+/+. La Figura 5B muestra un gráfico de barras que representa la proliferación inducida por citocinas de sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+. La proliferación inducida por IL-1β de sinoviocitos Prg4-/- fue significativamente mayor que la proliferación inducida por IL-1β de sinoviocitos Prg4+/+ (p<0,001) y la proliferación inducida por TNF-α de sinoviocitos Prg4-/- (p=0,002). La proliferación inducida por TNF-α de sinoviocitos Prg4-/- fue significativamente mayor que la proliferación inducida por TNF-α de sinoviocitos Prg4+/+ (p<0,001). La Figura 5C muestra un gráfico de barras del impacto del tratamiento con rhPRG4 sobre la proliferación de sinoviocitos de Prg4-/- inducida por citocinas en presencia y ausencia de IM7. (#) indica que los sinoviocitos Prg4-/- estimulados por citocinas tuvieron una absorbancia significativamente mayor en comparación con las células no tratadas (p<0,001). (*) indica que el tratamiento con rhPRG4 de sinoviocitos Prg4-/- estimulados con IL-1β redujo significativamente la proliferación celular en comparación con la IL-1β no tratada o el tratamiento con rhPRG4 + IM7 (p<0,001). (**) indica que el tratamiento con rhPRG4 de sinoviocitos Prg4-/- estimulados con TNF-α redujo significativamente la proliferación celular en comparación con los no tratados TNF-α o tratados con rhPRG4+IM7 (p<0,001).

La Figura 6 es la secuencia de aminoácidos de PRG4 humana de longitud completa (no truncada) (SEC ID NO:1: 1404 residuos). Los residuos 1-24 (mostrados en negrita) representan la secuencia señal y los residuos 25-1404 representan la secuencia madura de PRG4 humano. La glicoproteína no requiere la secuencia líder en su forma activa.

La Figura 7 es la secuencia de ácido nucleico para el gen PRG4 (SEQ ID NO:2) que codifica la proteína PRG4 humana 1404 AA de longitud completa.

Las Figuras 8A-B muestran cómo la administración de lipopolisacárido regula positivamente la producción de citocinas inflamatorias. La Figura 8A es una tabla que muestra el nivel medido de cada citocina presente en muestras de sangre total después de retar con solución salina (control) y después de retar con lipopolisacárido. Las concentraciones de las diversas citocinas representan una media de determinación duplicada y se expresan en pg/mL (ng/L). El cambio porcentual se muestra en el gráfico de barras de la Figura 8B y se basa en la comparación de los resultados estimulados por LPS con los del control salino.

Las Figuras 9A-B muestran cómo la administración de lubricina regula negativamente la producción de citocinas inflamatorias. La Figura 9A es una tabla que muestra el nivel medido de cada citocina presente en muestras de sangre total después de retar con solución salina (control) y después de retar con lubricina. Las concentraciones de las

diversas citocinas representan una media de determinación duplicada y se expresan en pg/mL (ng/L). El cambio porcentual para cada citocina individual se basa en la comparación de la muestra suplementada con lubricina con la del control salino y se muestra en el gráfico de barras de la Figura 9B.

Las Figuras 10A-B muestran cómo la administración de lubricina inhibe la generación de citocinas inflamatorias mediadas por LPS. La Figura 10A es una tabla que muestra el nivel medido de cada citocina presente en muestras de sangre total después de retar con LPS y LPS con lubricina. Las concentraciones de las diversas citocinas representan una media de determinación duplicada y se expresan en pg/mL (ng/L). El cambio porcentual para cada una de las citocinas individuales se basa en la comparación de LPS solo y LPS suplementado con lubricina y se muestra en el gráfico de barras de la Figura 10B.

Las Figuras 11A-B muestran cómo la administración de lubricina inhibe la generación de citocinas inflamatorias mediada por TNF-α. La Figura 11A es una tabla que muestra el nivel medido de cada citocina presente en muestras de sangre total después de reto con TNF-α y con lubricina y TNF-α. Las concentraciones de las diversas citocinas representan una media de determinación duplicada y se expresan en pg/mL (ng/L). El cambio porcentual para cada una de las citocinas individuales se basa en la comparación del TNF-α solo y TNF-α suplementado con lubricina y se muestra en el gráfico de barras en la Figura 11B.

Las Figuras 12A-B muestran cómo la administración de lubricina inhibe la generación de citocinas inflamatorias mediada por el factor tisular (TF). La Figura 12A es una tabla que muestra el nivel medido de cada citocina presente en muestras de sangre total después del reto con TF y con lubricina y TF. Las concentraciones de las diversas citocinas representan una media de determinación duplicada y se expresan en pg/mL (ng/L). El cambio porcentual para cada una de las citocinas individuales se basa en la comparación de TF solo y TF suplementado con lubricina y se muestra en el gráfico de barras de la Figura 12B.

La Figura 13 es un gráfico que muestra los niveles de EPO, IL-13, IL-10, IL-18, IL-1α, IL-2, MCSF, IL-1β, IL-4, IFN-γ, MIP-3α, GMCSF, IL-7, TNF-α, VEGF, MCP-1, IL-5, G-CSF, RANTES, IL-6, GRO, IL-17α, y IL-12p70 en muestras de suero tomadas de ratones de prueba que recibieron una administración intrarticular de lubricina humana recombinante después de la cirugía (desestabilización del menisco medial; barras grises) en comparación con los ratones control que recibieron cirugía pero se les administró solución salina en lugar de lubricina después de la cirugía (barras blancas).

Las Figuras 14A-B son gráficos de barras que muestran los niveles de citocinas expresadas por sinoviocitos humanos normales y osteoartríticos cuando se exponen a lubricina humana recombinante. La Figura 14A muestra las concentraciones de FGF-2 mientras que la Figura 14B muestra las concentraciones de IL-IRa.

Descripción detallada

La invención descrita en la presente descripción se basa en el descubrimiento de las propiedades antiinflamatorias previamente desconocidas y no apreciadas de PRG4, conocido, además, como lubricina. La invención explota las propiedades antiinflamatorias de PRG4 para proporcionar una serie de nuevos usos terapéuticos y profilácticos para PRG4. Por ejemplo, la invención encuentra aplicación en la reducción o inhibición de una respuesta inflamatoria en un paciente que tiene lesión cerebral.

Si bien es necesaria una respuesta inflamatoria para combatir infecciones y enfermedades, muchas afecciones inflamatorias son el resultado de respuestas inflamatorias excesivas o injustificadas. Tal es el caso, por ejemplo, con las afecciones autoinmunes, reacciones alérgicas, afecciones inflamatorias crónicas y sepsis. Mientras que en algunas situaciones, la inflamación puede crear dolor crónico o malestar y conducir a una baja calidad de vida, en otras situaciones, la inflamación puede ser mortal, como es el caso de la sepsis. En consecuencia, el descubrimiento de que PRG4 puede usarse como un agente antiinflamatorio, por ejemplo, para mitigar la inflamación cuando es excesiva o injustificada, ofrece la promesa de tratar afecciones inflamatorias crónicas o agudas y regular, reducir o inhibir los niveles de inflamación asociada.

Proteína PRG4

PRG4, conocido, además, como lubricina, es un polipéptido lubricante, que en los humanos se expresa a partir del gen del factor estimulante de megacariocitos (MSF), conocido, además, como PRG4 (ver el número de acceso NCBI AK131434 - U70136). La lubricina es una glucoproteína endógena ubicua que recubre las superficies articulares del cuerpo. La lubricina es una molécula de superficie altamente activa (por ejemplo, retiene el agua), que actúa principalmente como un potente citoprotector, antiadhesivo y lubricante de límites. La molécula tiene un dominio central largo similar a la mucina que está ubicado entre dominios proteicos terminales que permiten que la molécula se adhiera y proteja las superficies de los tejidos. Su forma natural, en todos los mamíferos investigados, contiene múltiples repeticiones de una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a KEPAPTT (SEQ ID NO:3). La lubricina natural típicamente comprende múltiples formas redundantes de esta repetición, que típicamente incluye residuos de prolina y treonina, con al menos una treonina glicosilada en la mayoría de las repeticiones. Las cadenas laterales de azúcar ligadas a O ancladas con treonina son críticas para la función de lubricación límite de la lubricina.

La porción de cadena lateral es típicamente un β(1-3)Gal-GalNAc, con el β(1-3)Gal-GalNAc típicamente tapado con ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico. El polipéptido contiene, además, oligosacáridos unidos a N. El gen que codifica la lubricina de longitud completa de origen natural contiene 12 exones, y el producto del gen MSF de origen natural contiene 1404 aminoácidos (incluida la secuencia de secreción) con múltiples homologías de secuencia de polipéptidos con vitronectina, incluidas regiones similares a la hemopexina y somatomedina. El exón 6 ubicado en el centro contiene 940 residuos. El exón 6 codifica el dominio repetido rico O-glicosilado similar a mucina.

La secuencia de aminoácidos del esqueleto proteico de la lubricina puede diferir en dependencia del empalme alternativo de los exones del gen MSF humano. Esta robustez contra la heterogeneidad se ejemplificó cuando los investigadores crearon una forma recombinante de lubricina a la que le faltaban 474 aminoácidos del dominio central de la mucina, pero aun así logró una lubricación razonable, aunque silenciada (Flannery y otros, Arthritis Rheum 2009; 60 (3):840-7). Se ha demostrado que PRG4 existe no solo como un monómero sino además, como un dímero y un multímero unidos por disulfuro a través de los dominios ricos en cisteína conservados en los extremos N y C. Lubris, LLC ha desarrollado una forma recombinante de lubricina humana de longitud completa. La molécula se expresa mediante el uso de la línea celular de ovario de hámster chino Selexis (CHO-M), con un peso molecular evidente final de 450-600 kDa, con multímeros polidispersos que miden frecuentemente a 1000 kDa o más, todo según lo estimado en comparación con los estándares de peso molecular en geles de poliacrilamida SDS tris-acetato 3-8 %. Del total de glicosilaciones, aproximadamente la mitad comprende dos unidades de azúcar (GalNAc-Gal) y la mitad tres unidades de azúcar (ácido GalNAc-Gal-Siálico). Este método de producción de PRG4 humana recombinante se describe en la Solicitud de Patente Internacional núm. PCT/US014/061827.

Puede usarse una cualquiera o más de diversas proteínas e isoformas de PRG4 nativas y recombinantes en las diversas modalidades descritas en la presente descripción. Por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,433,142; 6,743,774; 6,960,562; 7,030,223, y 7,361,738 describen cómo hacer diversas formas del producto de expresión de PRG4 humano. Se prefiere usar en la práctica de la invención el PRG4 recombinante o lubricina de longitud completa, glicosilado, expresado a partir de células CHO. Esta proteína comprende 1404 aminoácidos (ver la Figura 6; SEC. ID. NO:1) que incluye un exón central que comprende repeticiones de la secuencia KEPAPTT (SEC. ID. NO:3) glicosilada de forma diversa con oligosacáridos β(1-3) Gal-GalNAc ligados a O, e incluyen secuencias N y C-terminales con homología con vitronectina. La molécula es polidispersa con el patrón de glicosilación de las moléculas individuales variable, y puede comprender especies monoméricas, diméricas y multiméricas.

Como se usa en la presente descripción, el término "PRG4" se usa indistintamente con el término "lubricina". En términos generales, estos términos se refieren a cualquier proteína funcional PRG4 nativa o recombinante aislada o purificada, homólogos, fragmentos funcionales, isoformas y/o mutantes de los mismos. Todas las moléculas útiles comprenden la secuencia codificada por el exón 6, u homólogos o versiones truncadas de la misma, por ejemplo, versiones con menos repeticiones dentro de este dominio central de repetición KEPAPTT similar a mucina, preferiblemente junto con glicosilación unida a O. Todas las moléculas útiles comprenden, además, al menos las partes biológicamente activas de las secuencias codificadas por los exones 1-5 y 7-12, *es decir,* secuencias responsables de impartir a la molécula su afinidad por la ECM y las superficies endoteliales. En ciertas modalidades, una proteína PRG4 preferida tiene una masa molar promedio de entre 50 kDa y 500 kDa, preferiblemente entre 224 a 467 kDa, que comprende una o más porciones biológicamente activas de la proteína PRG4, o fragmentos funcionales, tales como un fragmento lubricante, o un homólogo del mismo. En una modalidad más preferida, una proteína PRG4 comprende monómeros de masa molar promedio de entre 220 kDa a aproximadamente 280 kDa.

Los métodos para el aislamiento, la purificación y la expresión recombinante de proteínas tales como la proteína PRG4 son bien conocidos en la técnica. En ciertos casos, el método comienza con la clonación y el aislamiento de ARNm y ADNc que codifican proteínas o isoformas de PRG4 mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular, tales como PCR o RT-PCR. El ADNc aislado que codifica la proteína o isoforma PRG4 se clona luego en un vector de expresión, y se expresa en una célula huésped para producir proteína PRG4 recombinante, y se aísla del sobrenadante del cultivo celular. Se proporciona un método para la producción de PRG4 humano recombinante en la Solicitud de Patente Internacional núm. PCT/US014/061827.

Hasta ahora, la función de PRG4 se ha asociado casi por completo con la reducción de la fricción y la prevención del desgaste entre las articulaciones articuladas y la lubricación de los tejidos de interfaz, tales como entre la superficie del ojo y el párpado. La importancia funcional de PRG4 en el mantenimiento de las articulaciones ha sido demostrada por mutaciones que causan el de la enfermedad síndrome de camptodactilia artropatía coxa- vara pericarditis (CACP) en humanos. La CACP se manifiesta por camptodactilia, artropatía no inflamatoria y sinovitis hipertrófica, con deformidad de la coxa vara, pericarditis y derrame pleural. Además, en ratones desactivados de PRG4, se observó deterioro del cartílago y posterior falla articular. Por lo tanto, la expresión de PRG4 es un componente necesario de las articulaciones sinoviales sanas. Sin embargo, el uso de un lubricante de límites sistémico como la proteína PRG4 como agente antiinflamatorio como se describe en la presente invención, hasta donde los solicitantes lo sepan, no se ha sugerido previamente.

PRG4 como agente antiinflamatorio

El descubrimiento de las propiedades antiinflamatorias de PRG4 se basa en la observación de varios mecanismos supuestos por los cuales PRG4 logra su efecto antiinflamatorio. Un mecanismo por el cual PRG4 produce un efecto antiinflamatorio implica CD44. Los solicitantes descubrieron que PRG4 se une a los receptores CD44, lo que le permite actuar como un antagonista del receptor CD44. Como resultado, PRG4 es capaz de regular negativamente las respuestas proinflamatorias mediadas por la señalización del receptor CD44.

CD44 es una glicoproteína y un receptor principal de la superficie celular con diversas isoformas generadas por el empalme alternativo y la glicosilación que desempeña un papel importante en la inflamación. (Cutly y otros, J Cell Biol 1992; 116(4):1055-62) y está involucrado en una variedad de interacciones célula-célula, metástasis tumoral y activación de linfocitos. CD44 se expresa en una gran cantidad de tipos de células de mamíferos y sus niveles de expresión varían entre los tipos de células y su estado de activación. Las células cancerosas o neoplásicas pueden expresar, además, CD44 y la presencia de CD44 en dichas células es indicativa de su participación en la regulación y metástasis del cáncer. En humanos, CD44 está codificado por el gen *CD44* en el cromosoma 1. La señalización a través de CD44 induce la proliferación de células T y la producción de IL-2, la mejora dependiente de la dosis-respuesta de la actividad citotóxica NK y la producción de citocinas y quimiocinas de macrófagos, así como otras funciones.

Un *ligando* bien establecido para CD44 es el hialuronano de alto peso molecular (HMW HA), donde HMW HA se une a un motivo extracelular en CD44 con homología con otras proteínas de unión a HA que dan como resultado la posterior absorción intracelular de HMW HA. (Knudson y otros, Matrix Biol 2002; 21(1):15-23; Harada y otros, J Biol Chem 2007; 282(8):5597-607; Tibesku y otros, Ann Rheum Dis 2006; 65(1):105-8). En modelos experimentales de osteoartritis, la expresión de CD44 de condrocitos aumenta con la progresión de la enfermedad y la expresión de CD44 en el cartílago articular puede correlacionarse con la gravedad de la enfermedad en humanos. (Fuchs y otros, J Orthop Res 2004;22(4):774-80; Zhang y otros, Mod Rheumatol 2013; 23(6):1186-91). Las interacciones HA/CD44 son frecuentes en una variedad de estados de enfermedad. Los carcinomas que surgen de los epitelios del colon tienden a desarrollarse en un microambiente rico en HA, en donde los receptores CD44 en las células epiteliales tumorales activan una vía de supervivencia celular mediada por tirosina quinasa, lo que conduce a una división y proliferación celular sin control (Misra S y otros, Connect Tissue Res. 2008;49(3):219-24). CD44 en las células endoteliales actúa para presentar HA a CD44 en los linfocitos T activados por antígeno, y así media una interacción rodante que dirige el reclutamiento de leucocitos de sitios inflamatorios (Johnson P y otros, Inflamm Allergy Drug Targets. Julio de 2009; 8(3):208-20), por ejemplo, en un modelo de isquemia reperfusión renal, la regulación positiva rápida de CD44 mediada por el reclutamiento de neutrófilos en las células endoteliales de los capilares renales y la función y la morfología degradadas del riñón, mientras que la deficiencia de CD44 redujo la entrada de neutrófilos independientemente del nivel de factores quimiotácticos expresados (Rouschop KMA y otros, JAm Soc Nephrol 2005;16:2034-43).

El papel de CD44 puede variar según el tipo de célula, el estado inflamatorio y por ser específico del sitio. Por ejemplo, se descubrió que la deficiencia de CD44 aumenta la inflamación en la neumonía inducida por *E. coli* pero no en la neumonía inducida por S. *neumonia*, lo que sugiere que las interacciones dependientes de CD44-HA pueden limitar en lugar de aumentar la respuesta inflamatoria a *E. coli* (Wang Q y otros, Am J Pathol. 2002 Dic;161(6):2219-28).

Otros ligandos de CD44 incluyen componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, colágenos, fibronectina y laminina (Naor y otros, Adv Cancer Res 1997;71:241-319; Knudson y otros, Cell Mol. Life Sci. 2002;59:36-44), metaloproteinasa-9 de matriz, el complejo proteico asociado a hialuronano derivado del suero HA (HA-SHAP), hemopexina, EMMPRIN, somatomedina-B, osteopontina, OKT3 o proteínas relacionadas con el complemento (como C3a, CD3, CD46).

Como muestran los datos presentados en el Ejemplo 1 a continuación, la interacción lubricina-CD44 muestra que esta glicoproteína tiene funciones más allá de sus propiedades mecánicas y lubricantes de límites. De hecho, los ejemplos 1A-D muestran que la lubricina actúa como un ligando, que se une a CD44. En consecuencia, debido a que la lubricina se une a CD44, la lubricina puede usarse como un antagonista de CD44 para evitar la unión de ligandos a CD44, tales como el ácido hialurónico, que dan como resultado una señalización proinflamatoria por parte de CD44. Además, debido a estas propiedades antiinflamatorias demostradas, la lubricina está indicada como un agente para tratar afecciones inflamatorias, reducir o inhibir la inflamación y reducir o inhibir una respuesta inflamatoria.

Otro mecanismo descubierto por los solicitantes a través del cual PRG4 proporciona un efecto antiinflamatorio es a través de la translocación de regulación negativa de NF-κB. NF-κB es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, es fundamental para la supervivencia celular y desempeña un papel clave en la regulación de la respuesta inmunitaria a la infección y, a su vez, en la regulación de la producción de citocinas. NF-κB generalmente se encuentra en el citoplasma de casi todos los tipos de células animales, y cuando es inducido por un estímulo, tal como el estrés, las citocinas, los radicales libres, la radiación ultravioleta, el LDL oxidado y los antígenos bacterianos o virales, migra al núcleo. La regulación incorrecta de NF-κB se ha relacionado con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, shock séptico, infección viral y desarrollo inmunitario inadecuado. La vía de señalización de NF-kB se ha considerado durante mucho tiempo un prototipo de vía proinflamatoria. La activación de la señalización de NF-kB se desencadena en una serie de etapas a través de una de las tres vías reconocibles: la canónica, la no canónica y los caminos independientes atípicos IκK. En su estado desactivado, NF-κB está unido a IκB. La señal de activación (por ejemplo, unión de TNF-α, IL-1α, LPS, CD40, Linfotoxina, UV, HER2/Neu, H_20_2 u otro

ligando) provoca la fosforilación de IκB y desencadena su degradación. El NF-κB libre desunido luego puede translocarse al núcleo y activar la transcripción, por ejemplo, de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión.

Como se muestra en el Ejemplo IF a continuación, la administración de lubricina puede reducir la translocación de NF-κB en un modelo de sinoviocito similar a fibroblastos de artritis reumatoide. Parece que el efecto de PRG4 sobre la translocación de NF-κB está mediado por el efecto de PRG4 en al menos CD44, como lo muestran los datos en el Ejemplo IF. En base a estos datos, PRG4 se indica como un agente antiinflamatorio y además, se indica como un agente para tratar afecciones inflamatorias, reducir o inhibir la inflamación y reducir o inhibir una respuesta inflamatoria. PRG4 se indica, además, como tratamiento para cualquier afección que pueda mejorarse al reducir la translocación de NF-κB. Esto incluye afecciones inflamatorias como NF-κB es un factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de muchas citocinas proinflamatorias producidas por el sistema inmunitario innato y adaptativo.

Los solicitantes han observado, además, que la lubricina logra su efecto antiinflamatorio al inhibir o regular negativamente la producción de una serie de citocinas proinflamatorias por mecanismos desconocidos. Como se muestra en los datos presentados en los Ejemplos 2 y 3 a continuación, la lubricina regula negativamente la producción de citocinas proinflamatorias y, por lo tanto, tiene un efecto antiinflamatorio. Este efecto se demostró con la generación de citocinas inflamatorias mediadas por lipopolisacárido (LPS), generación de citocinas inflamatorias mediadas por TNF-α y generación de citocinas inflamatorias mediadas por factor tisular (TF). En consecuencia, el efecto de la lubricina sobre la producción de citocinas proinflamatorias se ha verificado en varias vías diferentes.

La lubricina puede, además, lograr su efecto antiinflamatorio a través de su función como antiadhesivo/lubricante. Los solicitantes han observado que las mitocondrias en las células sometidas a estrés mecánico pueden deformarse, perturbar su función y conducir a la producción de especies reactivas oxidativas, muerte celular y producción de restos celulares localizados, y la consiguiente inflamación local. La acción lubricante de la lubricina presente en dichas células estresadas mecánicamente o cerca de ellas inhibe, además, el desarrollo de inflamación localizada en la medida en que mitiga el estrés mecánico en las células y sus mitocondrias.

En virtud de sus propiedades antiinflamatorias, la lubricina, en consecuencia, será útil como modulador paninmunitario y como agente antiinflamatorio para reducir o inhibir la respuesta inflamatoria, por ejemplo, al reducir o inhibir la generación de citocinas proinflamatorias. En consecuencia, la lubricina se indica como un agente para tratar afecciones inflamatorias, reducir o inhibir la inflamación y reducir o inhibir una respuesta inflamatoria.

En consecuencia, a través de estos modos de acción, PRG4 tiene la capacidad de regular negativamente varias vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria y, por lo tanto, es útil como agente antiinflamatorio. Como se describe en la presente descripción, la administración de PRG4 se indica para tratar una amplia variedad de afecciones y enfermedades inflamatorias y la inflamación asociada con esas afecciones.

Usos de PRG4 como agente antiinflamatorio

Debido a las propiedades antiinflamatorias de PRG4 descritas en la presente descripción, PRG4 está indicado para nuevos usos no apreciados previamente. PRG4 está indicado para su uso en un método para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria en un paciente con lesión cerebral.

Mientras que el paciente es preferiblemente un humano, el paciente puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un caballo, una vaca, un cerdo, una rata, un ratón, un perro o un gato.

Mientras que la lubricina se produce naturalmente dentro del cuerpo, los efectos de la invención se observan cuando se administra lubricina exógena al paciente. Por consiguiente, en una modalidad, el PRG4 administrado al paciente es lubricina humana exógena, mientras que en otra modalidad, el PRG4 administrado al paciente es lubricina humana recombinante (rhPRG4). En otra modalidad, rhPRG4 tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1.

La cantidad de lubricina administrada dependerá de variables tales como el nivel o el lugar de la inflamación, la extensión de la afección a tratar, la salud general del paciente, la formulación farmacéutica y la vía de administración. La dosificación inicial puede aumentar más allá del nivel superior para alcanzar rápidamente el nivel deseado en sangre o en tejido. Alternativamente, la dosis inicial puede ser menor que la óptima, y la dosis puede aumentarse progresivamente durante el curso del tratamiento. La dosis óptima puede determinarse mediante experimentación de rutina.

Para la administración, la lubricina se combina preferentemente con un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" significa tampones, portadores y excipientes adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación riesgo/beneficio razonable. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para el receptor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones,

disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores pueden incluir, además, biomateriales tales como matrices, hidrogeles, polímeros, armazones de tejidos y materiales portadores reabsorbibles, incluidas esponjas de colágeno. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Pueden prepararse formulaciones útiles por métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing Company, 1990). Los componentes de formulación adecuados para administración parenteral incluyen un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes como EDTA; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La lubricina para administración puede presentarse en una forma de unidad de dosificación y puede prepararse mediante cualquier método adecuado y debe formularse para que sea compatible con la ruta de administración prevista.

La invención contempla que PRG4 puede administrarse al paciente sistémicamente o localmente. La administración local puede estar justificada en casos donde la respuesta inflamatoria se localiza en un tejido u órgano específico y es posible acceder al tejido u órgano mediante, por ejemplo, inyección o administración local. Sin embargo, la administración sistémica está contemplada, además, por algunas modalidades de la invención. La administración sistémica puede estar justificada cuando la respuesta inflamatoria está localizada, pero la administración local no es factible o no está indicada. La administración sistémica, además, puede estar justificada cuando la respuesta inflamatoria no se localiza en un área del paciente, sino que se encuentra en todo el paciente o en más de una ubicación del paciente. Además, debido a que las células proinflamatorias viajan a través del sistema circulatorio del paciente, la administración sistémica puede ser el modo óptimo de administración para garantizar que PRG4 tenga la mayor oportunidad de interactuar y contrarrestar las actividades de las células proinflamatorias, por ejemplo, en el tratamiento de la sepsis.

Para su uso en la práctica de la invención, el PRG4 puede formularse en un portador, por ejemplo, suspendido en solución salina tamponada con fosfato, a concentraciones que varían de 1 µg/mL a 1000 µg/mL, y más preferiblemente, 100-500 µg/mL. Los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), opcionalmente en mezcla con tensioactivos tales como polisorbatos. El portador debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra microorganismos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos.

El momento de la administración dependerá de una variedad de factores y de la afección a tratar. Por ejemplo, en una modalidad, la administración de lubricina para tratar la inflamación que incide en una afección crónica puede dar como resultado la administración diaria, semanal, quincenal, dos veces al día o mensual. En otra modalidad, el tratamiento de la inflamación que incide en una afección aguda puede requerir la administración continua de lubricina, por ejemplo, por goteo intravenoso, durante un período fijo de tiempo.

En un aspecto, la respuesta inflamatoria es una respuesta inflamatoria aguda. En consecuencia, en un aspecto, la afección inflamatoria que se trata de acuerdo con la descripción, o la afección inflamatoria que sufre el paciente está relacionada o causada por una infección, por ejemplo, una infección viral, bacteriana, fúngica, parasitaria o por exposición a toxinas microbianas que inciden en la infección; necrosis, por ejemplo, causada por isquemia, trauma, lesión física o química, lesión térmica o irradiación; cuerpos extraños como astillas, suciedad, tejido extraño o suturas u otro implante médico; o una reacción inmunitaria como la hipersensibilidad, tal como alergias que provocan, por ejemplo, inflamación anafiláctica. En otro aspecto, la afección inflamatoria que se trata de acuerdo con la descripción, o la afección inflamatoria que sufre el paciente está relacionada o causada por una respuesta inflamatoria crónica tal como una lesión o infección persistente tal como tuberculosis o una úlcera; exposición prolongada a una toxina; alergia o una condición autoinmunitaria. Algunas afecciones inflamatorias crónicas incluyen diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedades pulmonares *(por ejemplo,* Tuberculosis), artritis *(por ejemplo,* Gota, osteoartritis), enfermedades autoinmunitarias *(por ejemplo,* esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus, enfermedad celíaca, etc.), y enfermedades neurológicas.

En algunos casos donde PRG4 se une a un receptor CD44 en una célula, la célula puede ser un glóbulo blanco (es decir, leucocito) como un linfocito (por ejemplo, células T, células B, células NK), neutrófilo, eosinófilo, basófilo y monocito, macrófago o célula dendrítica; célula adrenal; célula cerebral; célula cancerosa; célula cardíaca; condrocito; célula de colon; célula conjuntival; célula corneal; célula dendrítica; célula endotelial; célula epitelial; fibroblasto; célula de la vesícula biliar; célula gástrica; célula hepática; células inmunitarias tal como mastocitos, células dendríticas, linfocitos, leucocitos o macrófagos; célula intestinal; leucocito; célula límbica; célula pulmonar; linfocito macrófago mastocito; célula muscular; célula nerviosa; célula ocular u oftálmica; osteoblasto; osteoclasto; célula pancreática; célula rectal; célula renal; célula retiniana; célula de bazo; célula madre; sinoviocito; célula de timo; célula tiroidea; célula de malla trabecular; célula uretral; o célula vascular. Sin embargo, esta lista no es limitante.

En algunos casos donde la administración de PRG4 reduce o inhibe la translocación de NF-κB en una célula, la célula puede ser un glóbulo blanco (es decir, leucocito) tal como un linfocito (por ejemplo, células T, células B, células NK), neutrófilo, eosinófilo, basófilo y monocito, macrófago o células dendrítica; célula adrenal; célula cerebral; célula cancerosa; célula cardíaca; condrocitos; célula de colon; célula conjuntival; célula corneal; célula dendrítica; célula endotelial; célula epitelial; fibroblasto; célula de la vesícula biliar; célula gástrica; célula hepática; célula inmunitaria tales como mastocito, célula dendrítica, linfocito, leucocito o macrófago; célula intestinal; leucocito; célula límbica; célula pulmonar; linfocito; macrófago mastocito; célula muscular; célula nerviosa; célula ocular u oftálmica; osteoblasto; osteoclasto; célula pancreática; célula rectal; célula renal; célula retiniana; célula de bazo; célula madre; sinoviocito; célula de timo; célula tiroidea; célula de malla trabecular; célula uretral; o célula vascular. Sin embargo, esta lista no es limitante.

En algunos casos donde PRG4 se une a un receptor CD44 en una célula o donde la administración de PRG4 reduce o inhibe la translocación de NF-κB en una célula, cuando la célula es un sinoviocito, un condrocito, un osteocito, un osteoblasto, una célula de la retina, una célula límbica, una célula de malla trabecular, una célula corneal, una célula conjuntival, una célula ocular o una célula oftálmica, PRG4 se administra al paciente por vía sistémica.

En otro caso, la citocina proinflamatoria, cuya producción se inhibe o se reduce por la administración de lubricina es IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17α, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF-α, TNF-β (linfotoxina- α), linfotoxina- β, CXC31L (Fractalquina), 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, MIP3α, MG-CSF, o GCSF. En otro caso, la administración de lubricina reduce o inhibe el nivel de una o más, dos o más, o tres o más, o cuatro o más de las citocinas proinflamatorias mencionadas anteriormente.

La reducción o inhibición de la producción de una citocina proinflamatoria puede confirmarse por el nivel inferior de la citocina en una muestra de fluido corporal tomada del paciente después de la administración de lubricina en comparación con el nivel anterior. La muestra de fluido corporal puede ser sangre o plasma, por ejemplo. Dado que el efecto de la lubricina sobre un determinado nivel de citocinas puede no ser medible inmediatamente después de la administración de lubricina, puede observarse una reducción o inhibición en el transcurso de horas, días o semanas después de la administración inicial de lubricina.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para inhibir la unión de un ligando a CD44 presente en una superficie. De acuerdo con este método, la superficie está expuesta a la lubricina y la lubricina se une a CD44 e inhibe la unión del ligando.

En un caso, la superficie puede ser la superficie de una célula que expresa CD44, tal como una célula de mamífero. En otro caso, la superficie está en un detector de resonancia de plasmón superficial. En otro caso más, la superficie de la célula está en un humano.

Una célula que expresa CD44 puede incluir glóbulos blancos *(es decir,* leucocitos) tales como linfocitos (por ejemplo, células T, células B, células NK), neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, macrófagos y células dendríticas; células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, osteoblastos, células cardíacas, mastocitos, células musculares, células pulmonares, células renales, células hepáticas, células cerebrales, células del bazo, células uretrales, células vasculares, células nerviosas, células pancreáticas, células gástricas, células intestinales, células de colon, células rectales, células oculares u oftálmicas, células de la vesícula biliar y células madre.

En otro caso, una célula que expresa CD44 es una célula neoplásica o cancerosa. En un caso, una célula cancerosa incluye células de cáncer de mama, células de cáncer de colon, células de cáncer de endometrio, células de cáncer de ovario, células de cáncer de piel, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de hígado, células de cáncer renal, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de lengua, células de cáncer de páncreas, células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de próstata, células de cáncer uterino, células de carcinoma hepatocelular, células de cáncer gástrico, células de carcinoma nasofaríngeo, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer anal, células de osteosarcoma, células de liposarcoma, células de leiomiosarcoma, células de rabdomiosarcoma, células de neurofibrosarcoma, células de tumor del estroma gastrointestinal, células de tumor de vasos sanguíneos, células de fibrosarcoma, células de linfoma y células de cáncer de cerebro.

El ligando inhibido por la unión de PRG4 a CD44 presente en una superficie puede ser hialuronano (HA), un complejo de proteína asociada a hialuronano derivado de suero de hialuronano (HA-SHAP), metaloproteinasa-9 matriz, una citocina, una quimiocina, un interferón, una interleucina, una linfocina, un factor de necrosis tumoral, un factor de crecimiento o una hormona.

La lubricina puede proporcionarse en una cantidad que es insuficiente para proporcionar lubricación límite. Los solicitantes han determinado que los efectos de la lubricina sobre la unión a CD44 pueden lograrse a concentraciones

mucho más bajas que las necesarias para lograr la lubricación límite. Por consiguiente, en una modalidad, la lubricina se administra en una cantidad que varía de 0,1 µg/kg a 4000 µg/kg. La lubricina, en una modalidad, se administra sistémicamente, *es decir*, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, aunque puede administrarse localmente.

La célula que expresa CD44 puede ser una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana.

Como se describe en la presente descripción, PRG4 puede usarse para tratar la lesión cerebral causada por accidente cerebrovascular, embolia o trauma. Para el tratamiento de la lesión cerebral, se inyectará una solución concentrada de PRG4 IV después de un accidente cerebrovascular, embolia o trauma dentro de un período de tiempo limitado después de la lesión cerebral. Alternativamente, el PRG4 puede colocarse durante la cirugía cerebral en una ubicación en el cerebro durante dicha cirugía. Esta administración de dicha composición al cerebro está diseñada para estabilizar los vasos sanguíneos, limitar la permeabilidad vascular y conferir, además, un efecto antiinflamatorio.

Como se describió en la presente descripción, PRG4 puede reducir el nivel de citocinas proinflamatorias en el cuerpo. Las citocinas cuya producción puede inhibirse o reducirse mediante la administración de lubricina incluyen IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17α, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF-α, TNF-β (linfotoxina-α), linfotoxina-β, CXC31L (Fractalquina), 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, MIP3α, MG-CSF, o GCSF.

Como se describe en la presente descripción, PRG4 puede inhibir la translocación de NF-κB en una célula al inhibir la activación de la vía de señalización de NF-κB. PRG4 puede inhibir indirectamente la translocación de NF-κB al unirse a CD44 o al reducir o inhibir la señalización de CD44 o interactuar con otros receptores unidos a la superficie celular.

La reducción o inhibición mediada por RG4 de la translocación de NF-κB puede resultar en reducción de los niveles de citocinas proinflamatorias en sangre y, por lo tanto, puede usarse para tratar una afección inflamatoria.

Ejemplo 1: Evidencia experimental de que PRG4 antagoniza CD44 e inhibe las vías inflamatorias mediadas por CD44

Para evaluar la interacción entre el receptor humano de proteoglicano 4 y el de CD44 y la consecuencia de esta interacción sobre la proliferación de sinoviocitos inducida por citocinas proinflamatorias, se realizaron los siguientes experimentos.

La unión de rhPRG4 a CD44 y la competencia con ácido hialurónico de alto peso molecular (HMW HA) se evaluó mediante el uso de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) directo y por resonancia de plasmón superficial. Se realizó digestión de rhPRG4 con sialidasa-A y O-glucosidasa y se evaluó la unión a CD44 mediante el uso de ELISA. Los sinoviocitos similares a fibroblastos de la artritis reumatoide (RA-FLS) se estimularon con interleucina-1 beta (IL-1β) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) durante 48 horas en presencia o ausencia de rhPRG4 o HMW HA a las 20, 40 y 80 µg/mL y se midió la proliferación celular. La contribución de CD44 se evaluó mediante la incubación conjunta con un anticuerpo anti-CD44 (IM7). El efecto antiproliferativo de rhPRG4 se investigó después del tratamiento de sinoviocitos Prg4-/- con IL-1β o TNF α en presencia o ausencia de IM7.

Las variables se probaron inicialmente para determinar la normalidad y la igualdad de varianzas. Las variables que cumplieron ambos supuestos se probaron para determinar la significación estadística mediante la prueba *t de* Student o el análisis de varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones de dos grupos y más de dos grupos, respectivamente. Las variables que no cumplieron el supuesto de normalidad se probaron mediante la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA por rangos. El nivel de significación estadística se estableció en α=0,05. Los datos se representan gráficamente como el promedio **±** desviación estándar.

1 A. Unión de rhPRG4, HA de alto peso molecular, HA de peso molecular medio y vitronectina a CD44 mediante el uso de un ELISA directo

Las placas de microtitulación de alta unión (Corning, Sigma Aldrich, EE. UU.) se recubrieron con rhPRG4 (M_r≅240 KDa), HA de alto peso molecular (HMW HA; M_r≅1500 KDa) (R & D System, EE. UU.), HA de peso molecular medio (MMW HA; M_r≅300KDa) (R & D System) y vitronectina (M_r≅75 KDa) (Sigma Aldrich) a 400 µg/mL en tampón PBS (100 µL por pocillo) durante toda la noche a 4 °C. rhPRG4 es un producto de longitud completa producido por células CHO-M (Lubris, Framingham, MA, EE. UU.). Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, los pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2 % (BSA; 300 µL por pocillo) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron CD44-IgG_1Fc (R & D systems) o IgG_1Fc (R & D systems), cada uno a 1 µg/mL (100 µl por pocillo), a la placa y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, se añadió anti- IgG_1Fc-HRP (Sigma Aldrich) a una dilución 1: 10 000 (100 µL por pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, el ensayo se desarrolló mediante

el uso del reactivo ELISA Turbo TMB de la etapa 1 (ThermoScientific, EE. UU.) y se midió la absorbancia a 450 nm. Los datos representan un promedio de 4 ensayos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

La unión de rhPRG4, HMW HA, MMW HA y vitronectina a la proteína de fusión CD44-IgG_1Fc e IgG_1Fc se presenta en la Figura 1A. La absorbancia a 450 nm en el grupo CD44-IgG_1Fc fue significativamente mayor ($p<0,001$) que la absorbancia en el grupo IgG_1Fc para los pocillos recubiertos con rhPRG4, HMW HA y MMW HA. Por el contrario, no hubo diferencias significativas entre CD44-IgG_1Fc e IgG_1Fc en los pocillos recubiertos con vitronectina.

Estos datos muestran que rhPRG4 se une a CD44 e interfiere con la unión de HMW HA CD44. rhPRG4, HMW HA y MMW HA se unen específicamente al CD44 quimérico con una unión no específica extremadamente baja. Por el contrario, la vitronectina que comparte una homología de secuencia significativa con la lubricina no muestra ninguna especificidad hacia la unión a CD44. Debido a que rhPRG4 se une a CD44, puede funcionar como un antagonista de CD44, lo que interfiere con la señalización proinflamatoria de CD44.

1B. Unión dependiente de la concentración de rhPRG4, HMW HA, MMW HA a CD44 y competencia entre rhPRG4 y HA en la unión a CD44 mediante el uso de un ELISA directo

La unión dependiente de la concentración de rhPRG4, HMW HA y MMW HA a CD44 se realizó mediante el recubrimiento de placas de microtitulación con 400, 200, 100, 20, 4, 2 y 0,1 µg/mL de las macromoléculas. El ensayo se realizó como se describió anteriormente. Los valores de absorbancia en los pocillos IgG_1Fc se restaron de los valores de absorbancia en los pocillos CD44 IgG_1Fc y los valores de absorbancia corregidos para CD44 IgG_1Fc se normalizaron a los del grupo de rhPRG4 a 400 µ g/mL y los datos se expresaron como porcentaje de unión a CD44. La unión dependiente de la concentración de rhPRG4, HMW HA y MMW HA al CD44 recombinante se representa en la Figura 1B. El porcentaje de unión a CD44 recombinante fue significativamente mayor ($p<0,001$) en los pocillos recubiertos con rhPRG4 en comparación con los pocillos recubiertos con HMW HA o MMW HA para las concentraciones de 400, 100, 20, 4 y 2 µg/mL. Además, el porcentaje de unión a CD44 recombinante fue significativamente mayor ($p<0,001$) en los pocillos recubiertos con rhPRG4 en comparación con los pocillos recubiertos con MMW HA para las concentraciones de 200 µg/mL. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de unión a CD44 entre los pocillos recubiertos con rhPRG4, HMW HA y MMW HA a la concentración de 0,1 µg/mL. Los datos representan un promedio de 4 ensayos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

Para evaluar la competencia entre rhPRG4 y HMW HA o MMW HA en la unión a CD44, las placas de microtitulación se revistieron con CD44 IgG_1Fc o IgG_1Fc a 1 µg/mL (100 µL por pocillo) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, los pocillos se lavaron con PBS+Tween 20 al 0,1 % y los pocillos se bloquearon mediante el uso de BSA al 2 % (300 µL por pocillo) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Ya sea rhPRG4 a 5 µg/mL o una combinación de rhPRG4 (5 µg/mL) y HMW HA o MMW HA a 0,01, 0,05, 0,25, 1, 5 o 50 µg/mL se agregaron a los pocillos (100 µL por pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, se añadió anticuerpo monoclonal específico de lubricina (Mab 9G3) a 1:1000 (100 µL por pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, se añadió IgG-HRP de cabra anti-ratón (Thermo Scientific) a una dilución 1:1000 (100 µL por pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. El ensayo se desarrolló como se describió anteriormente. Los valores de absorbancia en los pocillos IgG_1Fc se restaron de los valores de absorbancia en los pocillos CD44-IgG_1Fc y los valores de absorbancia corregidos en los grupos rhPRG4+HA se normalizaron a los valores de absorbancia del grupo rhPRG4 y los datos se expresaron como porcentaje de unión a CD44. Los datos representan un promedio de 4 ensayos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

La competencia entre rhPRG4 y HMW HA o MMW HA por la unión al CD44 recombinante se presenta en la Figura 1C. HMW HA o MMW HA a 0,05, 0,25, 1,5 y 25 µg/mL redujo significativamente la unión de rhPRG4 a CD44 ($p<0,05$).

Estos datos demuestran que rhPRG4 se une a CD44 de una manera dependiente de la concentración con una afinidad comparable a HMW HA. Además, rhPRG4 compite con HMW HA por la unión a CD44. La presencia de un exceso de HMW o MMW HA redujo la unión de rhPRG4 a CD44 solo en aproximadamente 50 %. Estos datos sugieren que rhPRG4 es un antagonista de CD44; en consecuencia, tiene el potencial de interferir con la señalización proinflamatoria de CD44.

1C. Unión dependiente de la concentración de rhPRG4 a CD44 y competencia entre rhPRG4 y HMW HA mediante el uso de resonancia de plasmón superficial

Se investigó la unión de rhPRG4 a CD44-IgG_1Fc mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (Biacore T100, GE Healthcare Lifesciences, NJ, EE. UU.). Ver Figura 1C. Los chips de la Serie S se funcionalizaron mediante el uso del kit de captura de anticuerpos humanos (GE Life Sciences) y se permitió que CD44-IgG_1Fc o IgG_1FC se unieran a la superficie de los chips funcionalizados en la celda de flujo 1 (Fc_1) y la celda de flujo 2 (Fc_2), *respectivamente.* Se inyectó rhPRG4 a 30 µL/min durante 8 min a concentraciones de 300, 250, 200, 150, 100 y 50 µg/mL seguido de una disociación de 10 min mediante el uso de HEPES 0,1 M, NaCl 1,5 M, EDTA 30 mM y 0,5 % P20 (GE Life Sciences). La superficie del chip se regeneró al final de cada ciclo con un pulso de 1 min de $MgCl_2$ 3 M. Cada concentración de analito se inyectó por duplicado. Las curvas resultantes tenían doble referencia (es decir, Fc_2-Fc_1, seguido de la resta

de la curva 0 µg/mL). La cinética de unión y la afinidad de unión se determinaron mediante el software BiaEvaluation, mediante el uso del modelo de cambio de conformación/unión 1:1 o el equilibrio de estado estacionario, respectivamente. Para estudiar la competencia entre rhPRG4 y HMW HA por la unión a CD44, se inyectó rhPRG4 a concentraciones que oscilan entre 0 y 300 µg/mL como se describió anteriormente. Después del final de la fase de disociación, se inyectó HMW HA a 50 µg/mL (30 µL por minuto) durante 1 minuto. Las señales de unión de doble referencia de rhPRG4 (a diversas concentraciones) a CD44 se graficaron luego frente a las señales de unión generadas por la unión de HMW HA a CD44 después de las inyecciones de rhPRG4.

La unión de rhPRG4 a CD44 recombinante se confirmó mediante el uso de resonancia de plasmón superficial. rhPRG4 mostró una asociación dependiente de la concentración y disociación del CD44-IgG_1Fc inmovilizado (Figura 2A), con una evidente K_d de ≅ 38 nM basado en un peso molecular de rhPRG4 de 240 KDa. rhPRG4 interfirió con la unión de HMW HA a CD44 recombinante como se muestra por una relación inversa entre la intensidad de la señal de unión de HMW HA *(eje x)* y la intensidad de la señal de unión de rhPRG4 *(eje y)* (Figura 2B).

Estos datos demuestran que rhPRG4 se une a CD44 de una manera dependiente de la concentración con una afinidad comparable a HMW HA. Además, como se demostró en el Ejemplo 1B y 1C, la presencia de rhPRG4 unido a CD44 evitó que HMW HA se uniera a CD44 de una manera dependiente de la concentración y puede indicar que rhPRG4 y HMW HA comparten un sitio de unión común en el receptor. En el entorno de la articulación donde la concentración de HA SF es aproximadamente 10 veces mayor que la de lubricina, y en base a los datos de unión competitivos mostrados en la presente descripción, se espera que la lubricina pueda unirse al CD44 en la superficie de sinoviocitos y condrocitos y ejercer una función biológica mediada por CD44 en presencia de HA, lo que proporciona un papel homeostático conjunto al interferir con mediadores que de otro manera promueven la inflamación.

ID. Impacto de la eliminación de las glicosilaciones de dominio de mucina sobre la unión de rhPRG4 a CD44

La capacidad de lubricación límite de la lubricina está mediada por los oligosacáridos unidos a O (β1-3) Gal-GalNAc (Jay y otros Glucoconj J 2001; 18(10):807-15). Una combinación de digestiones con neuraminidasa y beta 1,3,6 galactosidasa redujo la capacidad de lubricación límite de lubricina en un 50 % (Jay y otros, Glucoconj J 2001; 18(10):807-15). La lubricina aislada de las muestras RA SF contiene estructuras de glicosilación de núcleo 1 aumentadas y muestra el epítopo sulfatado que se propone que forma parte del ligando de L-selectina (Estrella y otros, Biochem J 2010; 429(2):359-67). Además, la lubricina de RA SF se une a la L-selectina de manera dependiente de la glicosilación y recubre los granulocitos polimorfonucleares reclutados para la sinovia inflamada y SF de pacientes con RA (Jin y otros, J Biol Chem 2012; 287(43):35922-33).

rhPRG4 se digirió mediante el uso de sialidasa A (Prozyme, EE. UU.), O-glucosidasa (New England Biolabs, EE. UU.) o una combinación de sialidasa A y O-glucosidasa durante 16 horas a 37 °C. En la digestión de sialidasa A, se añadieron 12 µL de la enzima (1U/200 µL) a rhPRG4 en un volumen total de reacción de 180 µL y una concentración final de rhPRG4 de 300 µg/mL. En la digestión con O-glucosidasa, se añadieron 4,8 µL de la enzima (40 millones de unidades/mL) a rhPRG4 en un volumen total de reacción de 180 µL y una concentración final de rhPRG4 de 300 µg/mL en condiciones no desnaturalizantes. En la digestión de sialidasa-A y O-glucosidasa, las enzimas se usaron en volúmenes idénticos a los indicados anteriormente y se incubó con rhPRG4 en un volumen total de reacción y concentración final de rhPRG4 como se indicó anteriormente. El efecto de las digestiones de sialidasa-A y O-glucosidasa sobre el peso molecular evidente de rhPRG4 se determinó mediante SDS-PAGE mediante el uso de gel Bis-Tris al 4-12 % (NuPage, life technologies, EE. UU.). Un total de 20 µL de rhPRG4 o de rhPRG4 digerido con enzima se corrió en condiciones reductoras (200 mV durante 60 min) seguido de tinción con Gelcode Blue Stain (Thermo Scientific, EE. UU.). La unión de rhPRG4 digerido enzimáticamente a CD44 se comparó con rhPRG4 no digerido mediante el uso del enfoque ELISA directo descrito anteriormente y mediante el uso de una concentración de recubrimiento de rhPRG4 de 30 µg/mL. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

La digestión con sialidasa-A dio como resultado un aumento significativo ($p<0,001$) en el porcentaje de unión de rhPRG4 a CD44 en comparación con el control no tratado como se muestra en la Figura 3A. De manera similar, la digestión con O-glucosidasa dio como resultado un aumento significativo ($p=0,008$) en el porcentaje de unión de rhPRG4 a CD44 en comparación con el control no tratado. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de unión a CD44 entre rhPRG4 digerido con sialidasa-A y rhPRG4 codigerido con O-glucosidasa ($p=0,105$). El porcentaje de unión a CD44 en rhPRG4 digerido con sialidasa-A y O-glucosidasa fue significativamente mayor que rhPRG4 digerido con sialidasa-A ($p = 0,007$), rhPRG4 digerido con O-glucosidasa ($p<0,001$) y el control no tratado ($p<0,001$). La digestión de rhPRG4 con sialidasa-A y O-glucosidasa dio como resultado la reducción del peso molecular evidente de rhPRG4 hasta aproximadamente 200 KDa (Figura 3B).

La eliminación de ácido siálico y las O-glicosilaciones aumentaron significativamente la unión a CD44 de rhPRG4 ($p<0,001$). Los tratamientos con sialidasa-A y O-glucosidasa individualmente resultaron en la mejora de la unión de rhPRG4 al receptor CD44. Las digestiones acumulativas de sialidasa-A y O-glucosidasa dieron como resultado una unión aún más significativa de rhPRG4 a CD44 en comparación con las digestiones de enzimas individuales. La sialidasa-A escinde los residuos terminales ramificados y no ramificados del ácido siálico de las glicoproteínas, mientras que la O-glicosidasa cataliza la eliminación de los núcleos 1 y 2 de las glicoproteínas. La mejora en la unión a

CD44 indica que ni la glicosilación del núcleo 1 ni los residuos terminales de ácido siálico se requieren en la unión de rhPRG4 a CD44. En consecuencia, el nivel de sialilación y las glicosilaciones del núcleo 1 en el núcleo proteico de rhPRG4 no son esenciales para la capacidad de PRG4 de unirse a CD44. En cambio, la eliminación de estos residuos puede conducir a cambios conformacionales en la estructura semirrígida en forma de bastón de rhPRG4, que resulta en la mejora de la interacción con CD44.

1E. (ejemplo ilustrativo) Proliferación de sinoviocitos similares a fibroblastos de artritis reumatoide inducida por citocinas proinflamatorias e impacto del tratamiento con rhPRG4 o HMW HA.

La sinovia de los pacientes con RA contiene cantidades considerable de varias isoformas de CD44 y están presentes generalmente en un grado más alto en comparación con OA o con la sinovia normal (Naor y otros, Arthritis Res Ther 2003;5(3):105-15; Grisar y otros, Clin Exp Rheumatol 2012; 30(1):64-72). Los sinoviocitos similares a los fibroblastos de la artritis reumatoide (RA-FLS) juegan un papel importante en la invasividad de la sinovia de los pacientes con RA. La expresión de una variante de CD44 única (CD44v7/8) contribuye a la proliferación de RA-FLS *in vitro* (Wibulswas y otros, Am J Pathol 2000; 157(6):2037-2044) y agentes farmacológicos que se unen al CD44 de la superficie celular con el posterior desprendimiento del receptor han demostrado eficacia en modelos experimentales de artritis (Runnels y otros, Adv Ther 2010; 27(3):168-80).

Se usaron sinoviocitos similares a fibroblastos de artritis reumatoide (RA-FLS; Cell Applications, EE. UU.) entre los pases 3^{ro} y 6^{to} para llevar a cabo estos experimentos. En placas estériles de 96 pocillos, se cultivaron RA-FLS (5000 células por pocillo en 80 µL) en DMEM suplementado con piruvato 1 mM y estimulado con interleucina-1 beta humana recombinante (IL-1β; R & D systems) a 20 ng/mL o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α; R & D systems) a 5 ng/mL durante 48 horas a 37°C en ausencia o presencia de rhPRG4 o HMW HA a una concentración final de 20, 40 u 80 µg/mL. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µL. La proliferación celular, una indicación de inflamación, se determinó mediante el uso de CellTiter 96 AQueous una solución de prueba de proliferación celular (MTS; Promega, USA) y se determinó la absorbancia a 490 nm. Los datos se presentan como el número de veces de cambio en la absorbancia a 490 nm en comparación con el RA-FLS control no tratado. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento. Para evaluar la contribución de CD44 al efecto de rhPRG4 o HMW HA, se estimularon RA-FLS con IL-1β o TNF-α como se describió anteriormente. El tratamiento con rhPRG4 o HMW HA se realizó a una concentración final de 80 µg/mL en ausencia o presencia de IM7 (Abcam, EE. UU.), un anticuerpo neutralizante de CD44 que reconoce un epítopo conservado en todas las isoformas CD44 (Samson y otros, Exp Eye Res, 2014; 127C:14-19), a una dilución final de 1:200. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µl. La proliferación celular a través de los grupos experimentales se determinó como se describió anteriormente y los datos se presentan como el número de veces de cambios en la absorbancia a 490 nm en comparación con el control RA-FLS no tratado. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento.

La proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β y TNF-α durante un período de 48 horas se muestra en la Figura 4A. El tratamiento con 40 y 80 µg/mL de rhPRG4 o HMW HA suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS con la estimulación por IL-1β ($p<0,05$). El tratamiento con 20, 40 y 80 µg/mL de rhPRG4 suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS con estimulación por TNF-α ($p<0,05$). El tratamiento con HMW HA no resultó en la supresión de la proliferación de RA-FLS con TNF-α. El tratamiento conjunto con el anticuerpo IM7 anti-CD44 revirtió el efecto de rhPRG4 y HMW HA sobre los RA-FLS etimulados por IL-1β, como se muestra por la falta de diferencia significativa en el cambio de absorbancia entre los RA-FLS estimulados por IL-1β tratados con rhPRG4+IM7 o HMW HA+IM7 y los RA-FLS estimulados por IL-1β, como se muestra en la Figura 4B. De manera similar, el tratamiento conjunto con el anticuerpo IM7 revirtió el efecto de rhPRG4 sobre la proliferación de RA-FLS inducida por TNF-α.

rhPRG4 y HMW HA a 40 y 80 µg/mL suprimieron significativamente la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β ($p<0,05$). rhPRG4 a 20, 40 y 80 µg/mL suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS inducida por TNF-α ($p<0,05$). La neutralización de CD44 revirtió el efecto de rhPRG4 sobre los RA-FLS estimulados por IL-1β y TNF-α y el efecto de HMW HA sobre los RA-FLS estimulados por IL-1β.

La proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β and TNF-α con mayor proliferación celular observada por la estimulación con TNF-α, que está de acuerdo con otros informes publicados (por ejemplo, Lacey y otros, Arthritis Rheum 2003; 48(1):103-109). rhPRG4 inhibió la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β y TNF-α en un mecanismo que implica la unión a CD44. El efecto aguas abajo de la interacción de rhPRG4 y CD44 es la inhibición de la translocación nuclear de NF-κB. En este ensayo de proliferación celular, HMW HA inhibió la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β pero no inhibió la proliferación inducida por TNF-α. Al igual que con el tratamiento con rhPRG4, el efecto de HMW HA se revirtió con un anticuerpo CD44, lo que indica el papel de CD44 en la mediación de este efecto.

Estos datos muestran que rhPRG4 ejerce un efecto antiproliferativo y antiinflamatorio sobre RA-FLS posterior a la estimulación por IL-1β o TNF-α. Curiosamente, las concentraciones de rhPRG4 que demuestran este efecto antiproliferativo son generalmente más bajas que las concentraciones óptimas de rhPRG4 requeridas para proporcionar lubricación límite. Este efecto antiproliferativo de rhPRG4 está mediado por la interacción de CD44 con una inhibición posterior de la translocación nuclear de NF-κB, lo que sugiere que la lubricina aplicada terapéuticamente

puede mitigar los efectos de las citocinas proinflamatorias sobre la proliferación de tipos de células nocivas a través de un mecanismo dependiente de CD44.

1F. (ejemplo ilustrativo) Efecto del tratamiento con rhPRG4 sobre la translocación nuclear de NFκB después de estimulación de RA-FLS con TNF-α

Se cultivaron RA-FLS (400,000 células/pocillo) y se estimularon con TNF-α (5 ng/mL) y se trataron con rhPRG4 (200 µg/mL) o un inhibidor de translocación de NFκB disponible comercialmente MG 132 (3 µM; Tocris Bioscience) durante 24 horas en medios sin suero. Las células se cosecharon y la extracción nuclear se realizó mediante el uso de un kit comercialmente disponible (Thermo scientific). La proteína total se midió mediante el uso de un kit de ácido micro bicinchónico (BCA) (Thermo scientific) y se usaron 3 µg de extracto nuclear de cada grupo experimental. La subunidad p50 de NFκB se detectó en el extracto nuclear mediante el uso de un kit de ensayo de unión a NFκB ADN disponible comercialmente de (Abcam). Los datos se presentan como el número de veces de cambio en los niveles nucleares de NFκB en comparación con el control no tratado. Para evaluar si la inhibición de la translocación de NFκB por rhPRG4 depende de CD44, el experimento anterior se repitió en presencia o ausencia de anticuerpo CD44 IM7 (dilución 1:1000). Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento.

El tratamiento con TNF-α resultó en una translocación nuclear significativa de NFκB en comparación con los controles no tratados ($p<0,001$) (Figura 4C). El tratamiento con rhPRG4 o con el inhibidor de translocación de NFκB MG132 redujo significativamente la translocación nuclear de NFκB en comparación con los RA-FLS tratados con TNF-α ($p<0,001$). La translocación nuclear de NFκB en el grupo TNF-α+rhPRG4+IM7 fue significativamente mayor que la translocación de NFκB en el grupo TNF-α+rhPRG4 ($p<0,001$) y no fue significativamente diferente del grupo TNF-α. En consecuencia, el efecto antiproliferativo y antiinflamatorio de rhPRG4 está mediado por la interacción de CD44, con una inhibición posterior de la translocación nuclear de NFκB, lo que sugiere que rhPRG4 tiene la capacidad de reducir directamente los efectos proinflamatorios de la translocación nuclear de NF-κB a través de un mecanismo dependiente de CD44.

1G. (ejemplo ilustrativo) Aislamiento de sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ e inmunocitoquímica de CD44

Se cosechó tejido sinovial de ratones machos Prg4-/- y Prg4+/+ (8-10 semanas de edad; 5-8 animales por genotipo) y se digirió con enzima pronasa (2 mg/ml; Sigma Aldrich) en tampón HBSS estéril durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Esto se siguió por la digestión con colagenasa tipo I (1 mg/ml; Sigma Aldrich) durante 4 horas a 37 °C con agitación. La reacción enzimática se detuvo mediante el uso de DMEM+FBS al 10 %. Las células se cultivaron en DMEM+FBS al 10 % y se usaron sinoviocitos Prg4-/- entre los pases 2^{do} y 4^{to}, mientras que se usaron sinoviocitos Prg4+/+ en su segundo pase.

Los sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ se cultivaron en portaobjetos de cámara (Thermo Scientific). Las células se fijaron en formaldehído al 4 % durante 15 minutos y se lavaron dos veces con tampón PBS. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con tampón PBS. Las células se bloquearon con BSA al 2 % durante 30 minutos. Los sinoviocitos se incubaron con anticuerpo IM7 anti-CD44 (1:200) a 4 °C durante toda la noche. Después de lavar tres veces con PBS, los sinoviocitos se incubaron con IgG de cabra anti-rata Alexa Fluor 488 (Life Technologies) a una dilución 1:400 durante 1 hora en la oscuridad. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique de otra manera. Después del lavado con PBS durante 5 minutos, se añadió medio de montaje Vectashield que contiene DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA, EE. UU.). Se tomaron imágenes de las células con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i mediante el uso del software de imágenes NIS Elements.

La inmunocitoquímica de CD44 de los sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ se muestra en la Figura 5A. Se observó fluorescencia verde intensa, indicativa de la localización de CD44 y epítopos de CD44 no ocupados, para los sinoviocitos Prg4-/-. Alternativamente, no se observó fluorescencia o se observó verde tenue débil para los sinoviocitos de Prg4+/+, lo que indica que la mayoría de los receptores CD44 (epítopos) estaban ocupados o antagonizados por la expresión de Prg4 nativa. El tratamiento con IL-1β y TNF-α dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- en comparación con los sinoviocitos Prg4-/- no tratados ($p<0,001$) (Figura 5B). En contraste, solo la estimulación con IL-1β dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de sinoviocitos Prg4+/+ en comparación con los sinoviocitos Prg4+/+ no tratados ($p<0,001$). Además, el aumento en veces de la proliferación de los sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α fue significativamente mayor que el aumento en veces en la proliferación inducida por citocinas de los sinoviocitos Prg4+/+ ($p<0,001$).

El tratamiento con rhPRG4 inhibió significativamente la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α ($p<0,001$) (Figura 5C). El tratamiento conjunto con IM7 revirtió el efecto de rhPRG4. Esto se ilustra por el aumento significativo ($p<0,001$) en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- en los grupos IL-1β+rhPRG4+IM7 y TNF-α+rhPRG4+IM7 en comparación con los grupos IL-1β+rhPRG4 y TNF-α+rhPRG4, respectivamente. No hubo diferencias significativas en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- entre los grupos TNF-α+rhPRG4+IM7 y TNF-α. En contraste, la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- fue significativamente mayor en el grupo IL-1β que en el grupo IL-1β+rhPRG4+IM7 ($p<0,001$).

Los ratones Prg4-/- exhiben signos tempranos de degeneración del cartílago, demostrados por fibrilaciones superficiales y un aumento del coeficiente de fricción articular en comparación con los ratones Prg4+/- y Prg4+/+ (Jay y otros, Arthritis Rheum, 2007; 56(11):3662-9). Además, los ratones Prg4-/- exhiben un aumento de la tinción de condrocitos activados por caspasa-3 en el cartílago articular en comparación con el cartílago Prg4+/+ de la misma edad (Waller y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2013; 110(15): 5852-7) y son evidentes la hiperplasia sinovial y el crecimiento excesivo en ratones Prg4-/-, sin hiperplasia sinovial obvia en ratones Prg4+/- o Prg4+/+ (Rhee y otros, J. Clin. Invest, 2005; 115(3):622-31). Los sinoviocitos Prg4-/- muestran una tinción mejorada de CD44 en comparación con los sinoviocitos Prg4+/+. Además, las citocinas proinflamatorias indujeron una proliferación significativa de sinoviocitos Prg4-/- sin un efecto apreciable sobre sinoviocitos Prg4+/+. Combinadas, estas observaciones indican una inflamación en proceso en las articulaciones Prg4-/- con un fenotipo proliferativo de sinoviocitos similar al de RA-FLS. rhPRG4 inhibió la proliferación de sinoviocitos de Prg4-/- inducida por citocinas y este efecto estuvo mediado por la interacción de rhPRG4-CD44. La neutralización de CD44 revirtió completamente el efecto antiproliferativo de rhPRG4 después de estimulación con TNF-α y revirtió parcialmente el efecto antiproliferativo de rhPRG4 después del estímulo con IL-1β. Esta diferencia relacionada con la interacción rhPRG4-CD44 en el contexto de la estimulación de los sinoviocitos de Prg4-/- con TNF-α y IL-1β puede deberse potencialmente a la capacidad de rhPRG4 de modular otras vías de señalización independientemente de su capacidad de interactuar con CD44. En consecuencia, rhPRG4 inhibe la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α en un mecanismo que involucra CD44, y por lo tanto es un antagonista de CD44 capaz de regular negativamente la actividad proinflamatoria de la señalización de CD44.

Ejemplo ilustrativo 2. La lubricina modula la producción de citocinas inflamatorias en los sistemas de sangre total humana.

Los lipopolisacáridos (LPS) se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y provocan fuertes respuestas inmunitarias inflamatorias en los animales. El efecto del reto de LPS sobre la producción de citocinas inflamatorias se estudió en sangre total humana citratada mediante el uso de la tecnología Biochip Array para obtener el perfil de la generación de varias citocinas y la modulación de su producción. Se estudió la generación de IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, VEGF, IFNg, TNFa, IL1a, IL1b, MCP1 y EGF en muestras de sangre total citratada suplementada con solución salina (relación 1-10) y LPS a 10µg/ml en muestras incubadas durante 60 minutos a 37 °C. Estas mezclas se centrifugaron y se analizó el plasma sobrenadante para los 14 biomarcadores inflamatorios mediante el uso de una matriz de citocinas de alta sensibilidad en un lector de Biochip Randox Invesitigator. Estos estudios se realizaron por duplicado y se tabularon en forma de una tabla y una figura. Como se muestra en las Figuras 8A-B, la suplementación de lipopolisacáridos en una dilución 1:10 en sangre total da como resultado un aumento en la producción de las citocinas inflamatorias IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL1-β, y MCP-1 en las condiciones especificadas. No se observaron cambios en IL2, IFNg ni ILlb. La Figura 8B muestra los cambios porcentuales en los diversos parámetros que demuestran claramente un aumento pronunciado en IL6, IL8, VEGF y TNFa.

Mediante el uso del mismo enfoque, se estudió, además, el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias en sangre total mediante el uso de entornos experimentales similares. En estos estudios, se estudió el efecto de la lubricina (,57 mg/mL) mediante la suplementación a la sangre total citratada extraída de voluntarios sanos normales. Las muestras se procesaron para determinar los niveles de citocinas inflamatorias junto con un control de solución salina en muestras incubadas durante 60 minutos. La sangre total se centrifugó para obtener plasma que se procesó para diversas citocinas inflamatorias mediante el uso de un ensayo de citocinas de alta sensibilidad. Como se muestra en las Figuras 9A-B, la suplementación con lubricina a 0,57 mg/ml en sangre total resultó en una disminución en la producción de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β, MCP-1, y EGF. La disminución más prominente se observó en VEGF, IL8, IL6 e IL10.

El efecto de la lubricina en la generación de citocinas inflamatorias mediadas por LPS se estudió mediante el uso de la tecnología Biochip Array. En estos estudios, se comparó LPS solo a 10 ng/ml y pre-suplementación de LPS a 10 ng/ml seguido de suplementación con lubricina a 0,57 mg/ml en la sangre total citratada para la generación de diversas citocinas inflamatorias. Todas las muestras se incubaron durante 60 minutos y se centrifugaron para obtener plasma. Este plasma se analizó posteriormente mediante el uso de la matriz de biochips para citocinas inflamatorias. Se suplementó LPS a sangre total en una dilución 1:10. Como se muestra en las Figuras 10A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β, MCP-1 y EGF, aunque, como se discutió anteriormente, la presencia de LPS solo resultó en un aumento en la producción de cada una de estas citocinas. Como se muestra en la Figura 10B, la lubricina dio como resultado una disminución marcada en los niveles de EGF, IL10, VEGF, MCP1, ILlb y TNF. Estos datos sugieren que la suplementación de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediadas por LPS de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias mediada por TNF-α mediante el uso de la tecnología Biochip Array. Se usó TNF-α recombinante como desencadenante para generar citocinas inflamatorias en sangre total. Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de varias citocinas mediada por TNF-α. Se suplementó TNF-α solo a una concentración de 100 mg/ml a sangre total y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Se suplementó TNF-α a sangre total en una dilución 1:10. Se estudiaron los efectos moduladores de la lubricina sobre la generación de varias citocinas mediada por TNF-α al suplementar lubricina a 0,57 mg/ml en sangre total

inmediatamente antes de la adición de TNF-α. Después de 60 minutos, se obtuvo plasma de la centrifugación y se analizó la citocina inflamatoria mediante el uso de matrices Randox Biochip. Como se muestra en las Figuras 11A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β y EGF, aunque el reto con TNF-α solo resultó en la producción de cada una de estas citocinas. La Figura 11B muestra que la lubricina disminuyó los niveles de citocinas en un intervalo de 10-100 %. Se encontró que la disminución más dramática de la expresión de citocinas que estimuladas por TNF-α es la reducción de IFN-γ y TNF-α estimulados (como la lubricina evidentemente interrumpió un ciclo de retroalimentación positiva de producción de TNF-α) en comparación con la estimulación en ausencia de lubricina. Estos datos sugieren que la administración de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediada por TNF-α de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias mediadas por el factor de tejido recombinante (TF) mediante el uso de la tecnología Biochip Array. En estos estudios, se usó el factor tisular de la marca recombiplastina (Laboratorios IL) para desencadenar la generación de citocinas inflamatorias en sangre total humana. Se estudió el efecto de la lubricina a 0,57 mg/ml al suplementar este agente antes de la adición de factor tisular a la sangre total. El factor tisular solo sirvió como control positivo. Las muestras de sangre se centrifugaron y se recuperó el plasma. Este plasma se procesó luego para el perfil de citocinas inflamatorias en las matrices de Randox Biochip. TF se suplementó con sangre total en una dilución 1:10. Como se muestra en las Figuras 12A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-6, IL-8, VEGF, TNF-α, IE-1α, IL-1β, MCP-1 y EGF, aunque el reto con TF solo dio como resultado la producción de cada una de estas citocinas. Como se muestra en la Figura 12B, la lubricina produjo una disminución pronunciada en los niveles de TNF-α y de VEGF en muestras suplementadas con factor tisular. Estos datos sugieren que la administración de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediadas por TF de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Estos estudios muestran que la lubricina es capaz de inhibir la generación de diversas citocinas inflamatorias en la sangre total, que se suplementó con lipopolisacárido bacteriano (LPS), TNF-α y factor tisular. Todos estos agentes son mediadores de la inflamación. Por lo tanto, la lubricina es capaz de regular negativamente la generación de citocinas inflamatorias en una amplia variedad de mediadores.

Ejemplo ilustrativo 3. La lubricina reduce los niveles de citocinas proinflamatorias *in vivo*

Para determinar si la lubricina podría modular los niveles de citocinas proinflamatorias *in vivo,* se usó un modelo de rata. Nueve ratas se sometieron a cirugía para desestabilizar el menisco medial (cirugía DMM). Siete días después de la cirugía, cada rata recibió una dosis intrarticular única de lubricina de 200 µg/kg. Las ratas control recibieron una inyección de un volumen igual de solución salina. Los niveles de citocinas en las muestras de suero tomadas de los ratones de prueba se compararon con los ratones control que recibieron cirugía pero sin dosis de lubricina después de la cirugía. Las muestras se extrajeron 3 semanas después de la administración de la dosis de lubricina y se analizaron mediante el uso de la plataforma Luminex Multiplex. Los resultados se muestran en la Figura 13 donde se muestran los niveles medidos de EPO, IL-13, IL-10, IL-18, IL-1α, IL-2, MCSF, IL-1β, IL-4, IFN-γ, MIP-3α, GMCSF, IL-7, TNF-α, VEGF, MCP-1, IL-5, G-CSF, RANTES, IL-6, GRO, IL-17α, y IL-12p70. Los niveles de IL-18, MCSF, MCP-1, RANTES y GRO se redujeron en las ratas que recibieron lubricina en comparación con las ratas a las que se les inyectó solución salina sola. Más específicamente, esto muestra los amplios efectos antiinflamatorios de la lubricina, ya que este patrón de citocinas inflamatorias era distinto del perfil de los mediadores LPS y TF dominado por TNF-α/IL-6/IL-8 (que generalmente no estaban regulados positivamente en este modelo). No obstante, la lubricina fue capaz de reducir significativamente la producción de citocinas proinflamatorias *in vivo.*

Ejemplo ilustrativo 4. El efecto de la lubricina sobre los niveles de citocinas secretadas por sinoviocitos osteoartríticos humanos

Se obtuvieron células de líquido sinovial de pacientes normales y osteoartríticos (OA) y se purificaron con CD90+ después de un agotamiento de las células inmunitarias. Las células se colocaron en placas a 10 000 por pocillo y se suspendieron en medios que contenían DMEM, Hyclone FBS inactivado por calor (10 %) y Anti-Anti (1 %). Los ensayos contenían la suspensión celular (células + medios) a 180 µL y los ligandos a 20 µL para un volumen total de 200 µL. La lubricina recombinante (rhPRG4) se introdujo luego en las células a una concentración de 90 µg/mL y el control negativo fue PBS. La placa se incubó a 37 °C a 5 % de CO_2 durante 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes para el análisis de citocinas a través de la plataforma multiplex Luminex. Como se muestra en las Figuras 14A-B, las células normales no mostraron ningún cambio en la respuesta de las citocinas al comparar las condiciones de lubricina frente a PBS. Sin embargo, las células OA mostraron una regulación negativa en las citocinas FGF-2 e IL-IRa cuando se expusieron a lubricina. En consecuencia, en las células que ya exhiben una respuesta inflamatoria, tales como las células osteoartríticas probadas en la presente descripción, la administración de lubricina tiene la capacidad de reducir los niveles de citocinas proinflamatorias expresadas a partir de estas células.

Ejemplo 5. Tratamiento de la lesión cerebral

Durante el traumatismo craneoencefálico, con frecuencia hay contusiones del tejido cerebral y alteraciones de la integridad vascular que provocan hemorragia subaracnoidea y/o hematomas subdurales. En consecuencia, las

neuronas se pierden, lo que lleva a una función cerebral comprometida. Además, en los CVA y TIA, se forman uno o más coágulos intravasculares, que bloquean el suministro de oxígeno y nutrientes a las células cerebrales, incluidas las neuronas, en un volumen del cerebro aguas abajo del bloqueo. Esto conduce, además, a la destrucción de las neuronas, lo cual compromete la función cerebral. La respuesta inmunitaria del cerebro a la lesión implica una mayor producción de mediadores proinflamatorios y el reclutamiento de leucocitos en el área de la lesión. Esto contribuye al daño neuronal en las regiones cerebrales periféricas al sitio de la lesión, denominada "penumbra", y exacerba el daño cerebral. La neuroinflamación es uno de los mecanismos clave de la lesión secundaria, y está bien establecido que la neuroinflamación postraumática contribuye significativamente al daño neuronal que ocurre después de una lesión cerebral traumática. Una forma de limitar dicho daño cerebral es mediante la administración de agentes durante un corto intervalo (horas) después de la lesión, lo cual reduce la neuroinflamación y el daño neuronal resultante. Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención, rhPRG4, conocido, además, como lubricina, puede administrarse sistémicamente a través de la vasculatura o durante la cirugía para aliviar la presión en el cerebro, como un medio para limitar el daño cerebral. El apoyo para tal tratamiento está respaldado por los resultados que se presentan a continuación.

Aproximadamente una hora después de una lesión cerebral traumática en ratas, mediante el uso de un modelo establecido de lesión cerebral que involucra un impacto cortical controlado, se administró rhPRG4 por vía intravenosa a ratas de prueba a una dosis aproximada de 2,5 mg/Kg. Se administró solución salina normal (0,9 % de NaCl) por vía intravenosa a las ratas control. Un día después, se recolectaron los cerebros y las muestras de la corteza cerebral que rodeaban la lesión postraumática se analizaron mediante transferencia Western. El análisis demostró que rhPRG4 redujo la producción postraumática de mediadores proinflamatorios en comparación con los controles.

La galectina 3, cuya expresión cerebral aumenta rápidamente y se mantiene en un nivel alto durante un período prolongado después de una lesión cerebral traumática, se reguló negativamente en un 74 %. Además, se observó una reducción del 60 % en la magnitud del influjo postraumático de monocitos en el parénquima cerebral lesionado en las ratas tratadas con rhPRG4, en comparación con las ratas tratadas con solución salina normal, y además, rhPRG4 atenuó sustancialmente (en un 94 %) la síntesis postraumática de la metaloproteinasa 9 de matriz e inhibió (en un 64 %) la conversión de la metaloproteinasa pro-matriz 2 a su forma enzimáticamente activa. Además, rhPRG4 redujo en un 80 % la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual se evaluó mediante el nivel de albúmina en el tejido cerebral traumatizado.

La inyección de rhPRG4 marcado con fluorescencia mostró que ingresa al parénquima cerebral en las áreas lesionadas del cerebro, mientras que está totalmente ausente de las áreas no dañadas del cerebro. Junto con los resultados de estudios *in vitro que* involucran la línea celular monocítica THP-1, estas observaciones indican que rhPRG4 limita la magnitud de la neuroinflamación postraumática al inhibir directamente la actividad quimiotáctica de las células inflamatorias invasoras, y al reducir la producción y señalización de mediadores proinflamatorios.

Por lo tanto, rhPRG4 se dirige selectivamente a las áreas lesionadas del cerebro, lo que reduce la probabilidad de efectos farmacológicos fuera del objetivo. La hPRG4 recombinante limita, con alta eficacia, la magnitud de la neuroinflamación causada por una lesión cerebral traumática, al reducir la producción postraumática de mediadores proinflamatorios y la entrada de células inflamatorias. Además, rhPRG4 exhibe una capacidad única para estabilizar la barrera hematoencefálica. El descubrimiento de esta novedosa propiedad de rhPRG4 es de gran importancia para el tratamiento de la lesión cerebral, ya que la disfunción de la barrera hematoencefálica observada en la lesión cerebral no solo contribuye a la muerte neuronal en la etapa aguda de la lesión, sino que conduce, además, a cambios neurodegenerativos progresivos en el cerebro lesionado y, en consecuencia, malos resultados neurológicos.

Si bien las modalidades preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en la presente descripción, será evidente para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan solo a modo de ejemplo. Ahora se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que varias alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción pueden emplearse en la práctica de la invención y muchas otras modalidades de la invención serán evidentes para un experto en la técnica tras una revisión de la descripción y los ejemplos.

Se agregaron 0,01, 0,05, 0,25, 1, 5 o 50 µg/mL de HA o MMW HA a los pocillos (100 µL por pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, se añadió anticuerpo monoclonal específico de lubricina (Mab 9G3) a 1:1000 (100 µL por pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS+Tween 20 al 0,1 %, se añadió IgG-HRP de cabra anti-ratón (Thermo Scientific) a una dilución 1:1000 (100 µL por pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. El ensayo se desarrolló como se describió anteriormente. Los valores de absorbancia en los pocillos IgG_1Fc se restaron de los valores de absorbancia en los pocillos CD44-IgG_1Fc y los valores de absorbancia corregidos en los grupos rhPRG4+HA se normalizaron a los valores de absorbancia del grupo rhPRG4 y los datos se expresaron como porcentaje de unión a CD44. Los datos representan un promedio de 4 ensayos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

La competencia entre rhPRG4 y HMW HA o MMW HA por la unión al CD44 recombinante se presenta en la Figura 1C. HMW HA o MMW HA a 0,05, 0,25, 1, 5 y 25 µg/mL redujo significativamente la unión de rhPRG4 a CD44 ($p<0,05$).

Estos datos demuestran que rhPRG4 se une a CD44 de una manera dependiente de la concentración con una afinidad comparable a HMW HA. Además, rhPRG4 compite con HMW HA por la unión a CD44. La presencia de un exceso de HMW o MMW HA redujo la unión de rhPRG4 a CD44 solo en aproximadamente 50 %. Estos datos sugieren que rhPRG4 es un antagonista de CD44; en consecuencia, tiene el potencial de interferir con la señalización proinflamatoria de CD44.

1C. Unión dependiente de la concentración de rhPRG4 a CD44 y competencia entre rhPRG4 y HMW HA mediante el uso de resonancia de plasmón superficial

Se investigó la unión de rhPRG4 a CD44-IgG_1Fc mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (Biacore T100, GE Healthcare Lifesciences, NJ, EE. UU.). Ver Figura 1C. Los chips de la Serie S se funcionalizaron mediante el uso del kit de captura de anticuerpos humanos (GE Life Sciences) y se permitió que CD44-IgG_1Fc o IgG_1FC se unieran a la superficie de los chips funcionalizados en la celda de flujo 1 (Fc_1) y la celda de flujo 2 (Fc_2), *respectivamente.* Se inyectó rhPRG4 a 30 µL/min durante 8 min a concentraciones de 300, 250, 200, 150, 100 y 50 µg/mL seguido de una disociación de 10 min mediante el uso de HEPES 0,1 M, NaCl 1,5 M, EDTA 30 mM y 0,5 % P20 (GE Life Sciences). La superficie del chip se regeneró al final de cada ciclo con un pulso de 1 min de $MgCl_2$ 3 M. Cada concentración de analito se inyectó por duplicado. Las curvas resultantes tenían doble referencia (es decir, Fc_2-Fc_1, seguido de la resta de la curva 0 µg/mL). La cinética de unión y la afinidad de unión se determinaron mediante el software BiaEvaluation, mediante el uso del modelo de cambio de conformación/unión 1:1 o el equilibrio de estado estacionario, respectivamente. Para estudiar la competencia entre rhPRG4 y HMW HA por la unión a CD44, se inyectó rhPRG4 a concentraciones que oscilan entre 0 y 300 µg/mL como se describió anteriormente. Después del final de la fase de disociación, se inyectó HMW HA a 50 µg/mL (30 µL por minuto) durante 1 minuto. Las señales de unión de doble referencia de rhPRG4 (a diversas concentraciones) a CD44 se graficaron luego frente a las señales de unión generadas por la unión de HMW HA a CD44 después de las inyecciones de rhPRG4.

La unión de rhPRG4 a CD44 recombinante se confirmó mediante el uso de resonancia de plasmón superficial. rhPRG4 mostró una asociación dependiente de la concentración y disociación del CD44-IgG_1Fc inmovilizado (Figura 2A), con una evidente K_d de ≅ 38 nM basado en un peso molecular de rhPRG4 de 240 KDa. rhPRG4 interfirió con la unión de HMW HA a CD44 recombinante como se muestra por una relación inversa entre la intensidad de la señal de unión de HMW HA *(eje x)* y la intensidad de la señal de unión de rhPRG4 *(eje y)* (Figura 2B).

Estos datos demuestran que rhPRG4 se une a CD44 de una manera dependiente de la concentración con una afinidad comparable a HMW HA. Además, como se demostró en el Ejemplo 1B y 1C, la presencia de rhPRG4 unido a CD44 evitó que HMW HA se uniera a CD44 de una manera dependiente de la concentración y puede indicar que rhPRG4 y HMW HA comparten un sitio de unión común en el receptor. En el entorno de la articulación donde la concentración de HA SF es aproximadamente 10 veces mayor que la de lubricina, y en base a los datos de unión competitivos mostrados en la presente descripción, se espera que la lubricina pueda unirse al CD44 en la superficie de sinoviocitos y condrocitos y ejercer una función biológica mediada por CD44 en presencia de HA, lo que proporciona un papel homeostático conjunto al interferir con mediadores que de otro manera promueven la inflamación.

1D. Impacto de la eliminación de glicosilaciones de dominio de mucina en la unión de rhPRG4 a CD44

La capacidad de lubricación límite de la lubricina está mediada por los oligosacáridos unidos a O (β1-3) Gal-GalNAc (Jay y otros Glucoconj J 2001; 18(10):807-15). Una combinación de digestiones con neuraminidasa y beta 1,3,6 galactosidasa redujo la capacidad de lubricación límite de lubricina en un 50 % (Jay y otros, Glucoconj J 2001; 18(10):807-15). La lubricina aislada de las muestras RA SF contiene estructuras de glicosilación de núcleo 1 aumentadas y muestra el epítopo sulfatado que se propone que forma parte del ligando de L-selectina (Estrella y otros, Biochem J 2010; 429(2):359-67). Además, la lubricina de RA SF se une a la L-selectina de manera dependiente de la glicosilación y recubre los granulocitos polimorfonucleares reclutados para la sinovia inflamada y SF de pacientes con RA (Jin y otros, J Biol Chem 2012; 287(43):35922-33).

rhPRG4 se digirió mediante el uso de sialidasa A (Prozyme, EE. UU.), O-glucosidasa (New England Biolabs, EE. UU.) o una combinación de sialidasa A y O-glucosidasa durante 16 horas a 37 °C. En la digestión de sialidasa A, se añadieron 12 µL de la enzima (1U/200 µL) a rhPRG4 en un volumen total de reacción de 180 µL y una concentración final de rhPRG4 de 300 µg/mL. En la digestión con O-glucosidasa, se añadieron 4,8 µL de la enzima (40 millones de unidades/mL) a rhPRG4 en un volumen total de reacción de 180 µL y una concentración final de rhPRG4 de 300 µg/mL en condiciones no desnaturalizantes. En la digestión de sialidasa-A y O-glucosidasa, las enzimas se usaron en volúmenes idénticos a los indicados anteriormente y se incubó con rhPRG4 en un volumen total de reacción y concentración final de rhPRG4 como se indicó anteriormente. El efecto de las digestiones de sialidasa-A y O-glucosidasa sobre el peso molecular evidente de rhPRG4 se determinó mediante SDS-PAGE mediante el uso de gel Bis-Tris al 4-12 % (NuPage, life technologies, EE. UU.). Un total de 20 µL de rhPRG4 o de rhPRG4 digerido con enzima se corrió en condiciones reductoras (200 mV durante 60 min) seguido de tinción con Gelcode Blue Stain (Thermo Scientific, EE. UU.). La unión de rhPRG4 digerido enzimáticamente a CD44 se comparó con rhPRG4 no digerido mediante el uso del enfoque ELISA directo descrito anteriormente y mediante el uso de una concentración de

recubrimiento de rhPRG4 de 30 µg/mL. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes, cada uno con pocillos por triplicado por grupo.

La digestión con sialidasa-A dio como resultado un aumento significativo ($p<0,001$) en el porcentaje de unión de rhPRG4 a CD44 en comparación con el control no tratado, como se muestra en la Figura 3A. De manera similar, la digestión con O-glucosidasa dio como resultado un aumento significativo ($p=0,008$) en el porcentaje de unión de rhPRG4 a CD44 en comparación con el control no tratado. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de unión a CD44 entre rhPRG4 digerido con sialidasa-A y rhPRG4 codigerido con O-glucosidasa ($p=0,105$). El porcentaje de unión a CD44 en rhPRG4 digerido con sialidasa-A y O-glucosidasa fue significativamente mayor que rhPRG4 digerido con sialidasa-A ($p = 0,007$), rhPRG4 digerido con O-glucosidasa ($p<0,001$) y el control no tratado ($p<0,001$). La digestión de rhPRG4 con sialidasa-A y O-glucosidasa dio como resultado la reducción del peso molecular evidente de rhPRG4 hasta aproximadamente 200 KDa (Figura 3B).

La eliminación de ácido siálico y las O-glicosilaciones aumentaron significativamente la unión a CD44 de rhPRG4 ($p<0,001$). Los tratamientos con sialidasa-A y O-glucosidasa individualmente resultaron en la mejora de la unión de rhPRG4 al receptor CD44. Las digestiones acumulativas de sialidasa-A y O-glucosidasa dieron como resultado una unión aún más significativa de rhPRG4 a CD44 en comparación con las digestiones de enzimas individuales. La sialidasa-A escinde los residuos terminales ramificados y no ramificados del ácido siálico de las glicoproteínas, mientras que la O-glicosidasa cataliza la eliminación de los núcleos 1 y 2 de las glicoproteínas. La mejora en la unión a CD44 indica que ni la glicosilación del núcleo 1 ni los residuos terminales de ácido siálico se requieren en la unión de rhPRG4 a CD44. En consecuencia, el nivel de sialilación y las glicosilaciones del núcleo 1 en el núcleo proteico de rhPRG4 no son esenciales para la capacidad de PRG4 de unirse a CD44. En cambio, la eliminación de estos residuos puede conducir a cambios conformacionales en la estructura semirrígida en forma de bastón de rhPRG4, que resulta en la mejora de la interacción con CD44.

1E. Proliferación de sinoviocitos similares a fibroblastos de la artritis reumatoide inducida por las citocinas proinflamatorias e impacto del tratamiento con rhPRG4 o HMW HA.

La sinovia de los pacientes con RA contiene cantidades considerable de varias isoformas de CD44 y están presentes generalmente en un grado más alto en comparación con OA o con la sinovia normal (Naor y otros, Arthritis Res Ther 2003;5(3):105-15; Grisar y otros, Clin Exp Rheumatol 2012; 30(1):64-72). Los sinoviocitos similares a los fibroblastos de la artritis reumatoide (RA-FLS) juegan un papel importante en la invasividad de la sinovia de los pacientes con RA. La expresión de una variante de CD44 única (CD44v7/8) contribuye a la proliferación de RA-FLS *in vitro* (Wibulswas y otros, Am J Pathol 2000; 157(6):2037-2044) y agentes farmacológicos que se unen al CD44 de la superficie celular con el posterior desprendimiento del receptor han demostrado eficacia en modelos experimentales de artritis (Runnels y otros, Adv Ther 2010; 27(3):168-80).

Se usaron sinoviocitos similares a fibroblastos de artritis reumatoide (RA-FLS; Cell Applications, EE. UU.) entre los pases 3^{ro} y 6^{to} para llevar a cabo estos experimentos. En placas estériles de 96 pocillos, se cultivaron RA-FLS (5000 células por pocillo en 80 µL) en DMEM suplementado con piruvato 1 mM y estimulado con interleucina-1 beta humana recombinante (IL-1β; R & D systems) a 20 ng/mL o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α; R & D systems) a 5 ng/mL durante 48 horas a 37°C en ausencia o presencia de rhPRG4 o HMW HA a una concentración final de 20, 40 u 80 µg/mL. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µL. La proliferación celular, una indicación de inflamación, se determinó mediante el uso de CellTiter 96 AQueous una solución de prueba de proliferación celular (MTS; Promega, USA) y se determinó la absorbancia a 490 nm. Los datos se presentan como el número de veces de cambio en la absorbancia a 490 nm en comparación con el RA-FLS control no tratado. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento. Para evaluar la contribución de CD44 al efecto de rhPRG4 o HMW HA, se estimularon RA-FLS con IL-1β o TNF-α como se describió anteriormente. El tratamiento con rhPRG4 o HMW HA se realizó a una concentración final de 80 µg/mL en ausencia o presencia de IM7 (Abcam, EE. UU.), un anticuerpo neutralizante de CD44 que reconoce un epítopo conservado en todas las isoformas CD44 (Samson y otros, Exp Eye Res, 2014; 127C:14-19), a una dilución final de 1:200. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µl. La proliferación celular a través de los grupos experimentales se determinó como se describió anteriormente y los datos se presentan como el número de veces de cambios en la absorbancia a 490 nm en comparación con el control RA-FLS no tratado. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento.

La proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β y TNF-α durante un período de 48 horas se muestra en la Figura 4A. El tratamiento con 40 y 80 µg/mL de rhPRG4 o HMW HA suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS con la estimulación por IL-1β ($p<0,05$). El tratamiento con 20, 40 y 80 µg/mL de rhPRG4 suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS con estimulación por TNF-α ($p<0,05$). El tratamiento con HMW HA no resultó en la supresión de la proliferación de RA-FLS con TNF-α. El tratamiento conjunto con el anticuerpo IM7 anti-CD44 revirtió el efecto de rhPRG4 y HMW HA sobre los RA-FLS etimulados por IL-1β, como se muestra por la falta de diferencia significativa en el cambio de absorbancia entre los RA-FLS estimulados por IL-1β tratados con rhPRG4+IM7 o HMW HA+IM7 y los RA-FLS estimulados por IL-1β, como se muestra en la Figura 4B. De manera similar, el tratamiento conjunto con el anticuerpo IM7 revirtió el efecto de rhPRG4 sobre la proliferación de RA-FLS inducida por TNF-α.

rhPRG4 y HMW HA a 40 y 80 µg/mL suprimieron significativamente la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β ($p<0,05$). rhPRG4 a 20, 40 y 80 µg/mL suprimió significativamente la proliferación de RA-FLS inducida por TNF-α ($p<0,05$). La neutralización de CD44 revirtió el efecto de rhPRG4 sobre los RA-FLS estimulados por IL-1β y TNF-α y el efecto de HMW HA sobre los RA-FLS estimulados por IL-1β.

La proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β y TNF-α con proliferación celular más alta se observó con la estimulación por TNF-α, lo que concuerda con otros informes publicados (por ejemplo, Lacey et al. Arthritis Rheum 2003;48(1): 103-109). rhPRG4 inhibió la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β and TNF-α, en un mecanismo que implica unión a CD44. El efecto aguas abajo de la interacción de rhPRG4 y CD44 es la inhibición de la translocación nuclear de NF-κB. En este ensayo de proliferación celular, HMW HA inhibió la proliferación de RA-FLS inducida por IL-1β pero no inhibió la proliferación inducida por TNF-α. Al igual que con el tratamiento con rhPRG4, el efecto de HMW HA se revirtió con un anticuerpo CD44, lo que indica el papel de CD44 en la mediación de este efecto.

Estos datos muestran que rhPRG4 ejerce un efecto antiproliferativo y antiinflamatorio sobre RA-FLS posterior a la estimulación por IL-1β o TNF-α. Curiosamente, las concentraciones de rhPRG4 que demuestran este efecto antiproliferativo son generalmente más bajas que las concentraciones óptimas de rhPRG4 requeridas para proporcionar lubricación límite. Este efecto antiproliferativo de rhPRG4 está mediado por la interacción de CD44 con una inhibición posterior de la translocación nuclear de NF-κB, lo que sugiere que la lubricina aplicada terapéuticamente puede mitigar los efectos de las citocinas proinflamatorias sobre la proliferación de tipos de células nocivas a través de un mecanismo dependiente de CD44.

1F. Efecto del tratamiento con rhPRG4 sobre la translocación nuclear de NFκB después de la estimulación de RA-FLS con TNF-α

Se cultivaron RA-FLS (400,000 células/pocillo) y se estimularon con TNF-α (5 ng/mL) y se trataron con rhPRG4 (200 µg/mL) o un inhibidor de translocación de NFκB disponible comercialmente MG 132 (3 µM; Tocris Bioscience) durante 24 horas en medios sin suero. Las células se cosecharon y la extracción nuclear se realizó mediante el uso de un kit comercialmente disponible (Thermo scientific). La proteína total se midió mediante el uso de un kit de ácido micro bicinchónico (BCA) (Thermo scientific) y se usaron 3 µg de extracto nuclear de cada grupo experimental. La subunidad p50 de NFκB se detectó en el extracto nuclear mediante el uso de un kit de ensayo de unión a NFκB ADN disponible comercialmente de (Abcam). Los datos se presentan como el número de veces de cambio en los niveles nucleares de NFκB en comparación con el control no tratado. Para evaluar si la inhibición de la translocación de NFκB por rhPRG4 depende de CD44, el experimento anterior se repitió en presencia o ausencia de anticuerpo CD44 IM7 (dilución 1:1000). Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con al menos tres pocillos por tratamiento.

El tratamiento con TNF-α resultó en una translocación nuclear significativa de NFκB en comparación con los controles no tratados ($p<0,001$) (Figura 4C). El tratamiento con rhPRG4 o con el inhibidor de translocación de NFκB MG132 redujo significativamente la translocación nuclear de NFκB en comparación con los RA-FLS tratados con TNF-α ($p<0,001$). La translocación nuclear de NFκB en el grupo TNF-α+rhPRG4+IM7 fue significativamente mayor que la translocación de NFκB en el grupo TNF-α+rhPRG4 ($p<0,001$) y no fue significativamente diferente del grupo TNF-α. En consecuencia, el efecto antiproliferativo y antiinflamatorio de rhPRG4 está mediado por la interacción de CD44, con una inhibición posterior de la translocación nuclear de NFκB, lo que sugiere que rhPRG4 tiene la capacidad de reducir directamente los efectos proinflamatorios de la translocación nuclear de NF-κB a través de un mecanismo dependiente de CD44.

1G. Aislamiento de sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ e inmunocitoquímica CD44

Se cosechó tejido sinovial de ratones machos Prg4-/- y Prg4+/+ (8-10 semanas de edad; 5-8 animales por genotipo) y se digirió con enzima pronasa (2 mg/ml; Sigma Aldrich) en tampón HBSS estéril durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Esto se siguió por la digestión con colagenasa tipo I (1 mg/ml; Sigma Aldrich) durante 4 horas a 37 °C con agitación. La reacción enzimática se detuvo mediante el uso de DMEM+FBS al 10 %. Las células se cultivaron en DMEM+FBS al 10 % y se usaron sinoviocitos Prg4-/- entre los pases 2^{do} y 4^{to}, mientras que se usaron sinoviocitos Prg4+/+ en su segundo pase.

Los sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ se cultivaron en portaobjetos de cámara (Thermo Scientific). Las células se fijaron en formaldehído al 4 % durante 15 minutos y se lavaron dos veces con tampón PBS. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con tampón PBS. Las células se bloquearon con BSA al 2 % durante 30 minutos. Los sinoviocitos se incubaron con anticuerpo IM7 anti-CD44 (1:200) a 4 °C durante toda la noche. Después de lavar tres veces con PBS, los sinoviocitos se incubaron con IgG de cabra anti-rata Alexa Fluor 488 (Life Technologies) a una dilución 1:400 durante 1 hora en la oscuridad. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique de otra manera. Después del lavado con PBS durante 5 minutos, se añadió medio de montaje Vectashield que contiene DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA, EE. UU.). Se tomaron imágenes de las células con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i mediante el uso del software de imágenes NIS Elements.

La inmunocitoquímica de CD44 de los sinoviocitos Prg4-/- y Prg4+/+ se muestra en la Figura 5A. Se observó fluorescencia verde intensa, indicativa de la localización de CD44 y epítopos de CD44 no ocupados, para los sinoviocitos Prg4-/-. Alternativamente, no se observó fluorescencia o se observó verde tenue débil para los sinoviocitos de Prg4+/+, lo que indica que la mayoría de los receptores CD44 (epítopos) estaban ocupados o antagonizados por la expresión de Prg4 nativa. El tratamiento con IL-1β y TNF-α dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- en comparación con los sinoviocitos Prg4-/- no tratados ($p<0,001$) (Figura 5B). En contraste, solo la estimulación con IL-1β dio como resultado un aumento significativo en la proliferación de sinoviocitos Prg4+/+ en comparación con los sinoviocitos Prg4+/+ no tratados ($p<0,001$). Además, el aumento en veces de la proliferación de los sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α fue significativamente mayor que el aumento en veces en la proliferación inducida por citocinas de los sinoviocitos Prg4+/+ ($p<0,001$).

El tratamiento con rhPRG4 inhibió significativamente la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α ($p<0,001$) (Figura 5C). El tratamiento conjunto con IM7 revirtió el efecto de rhPRG4. Esto se ilustra por el aumento significativo ($p<0,001$) en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- en los grupos IL-1β+rhPRG4+IM7 y TNF-α+rhPRG4+IM7 en comparación con los grupos IL-1β+rhPRG4 y TNF-α+rhPRG4, respectivamente. No hubo diferencias significativas en la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- entre los grupos TNF-α+rhPRG4+IM7 y TNF-α. En contraste, la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- fue significativamente mayor en el grupo IL-1β que en el grupo IL-1β+rhPRG4+IM7 ($p<0,001$).

Los ratones Prg4-/- exhiben signos tempranos de degeneración del cartílago, demostrados por fibrilaciones superficiales y un aumento del coeficiente de fricción articular en comparación con los ratones Prg4+/- y Prg4+/+ (Jay y otros, Arthritis Rheum, 2007; 56(11):3662-9). Además, los ratones Prg4-/- exhiben un aumento de la tinción de condrocitos activados por caspasa-3 en el cartílago articular en comparación con el cartílago Prg4+/+ de la misma edad (Waller y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2013; 110(15): 5852-7) y son evidentes la hiperplasia sinovial y el crecimiento excesivo en ratones Prg4-/-, sin hiperplasia sinovial obvia en ratones Prg4+/- o Prg4+/+ (Rhee y otros, J. Clin. Invest, 2005; 115(3):622-31). Los sinoviocitos Prg4-/- muestran una tinción mejorada de CD44 en comparación con los sinoviocitos Prg4+/+. Además, las citocinas proinflamatorias indujeron una proliferación significativa de sinoviocitos Prg4-/- sin un efecto apreciable sobre sinoviocitos Prg4+/+. Combinadas, estas observaciones indican una inflamación en proceso en las articulaciones Prg4-/- con un fenotipo proliferativo de sinoviocitos similar al de RA-FLS. rhPRG4 inhibió la proliferación de sinoviocitos de Prg4-/- inducida por citocinas y este efecto estuvo mediado por la interacción de rhPRG4-CD44. La neutralización de CD44 revirtió completamente el efecto antiproliferativo de rhPRG4 después de estimulación con TNF-α y revirtió parcialmente el efecto antiproliferativo de rhPRG4 después del estímulo con IL-1β. Esta diferencia relacionada con la interacción rhPRG4-CD44 en el contexto de la estimulación de los sinoviocitos de Prg4-/- con TNF-α y IL-1β puede deberse potencialmente a la capacidad de rhPRG4 de modular otras vías de señalización independientemente de su capacidad de interactuar con CD44. En consecuencia, rhPRG4 inhibe la proliferación de sinoviocitos Prg4-/- inducida por IL-1β y TNF-α en un mecanismo que involucra CD44, y por lo tanto es un antagonista de CD44 capaz de regular negativamente la actividad proinflamatoria de la señalización de CD44.

Ejemplo 2. La lubricina modula la producción de citocinas inflamatorias en los sistemas de sangre total humana.

Los lipopolisacáridos (LPS) se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y provocan fuertes respuestas inmunitarias inflamatorias en los animales. El efecto del reto de LPS sobre la producción de citocinas inflamatorias se estudió en sangre total humana citratada mediante el uso de la tecnología Biochip Array para obtener el perfil de la generación de varias citocinas y la modulación de su producción. Se estudió la generación de IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, VEGF, IFNg, TNFa, ILla, ILlb, MCP1 y EGF en muestras de sangre total citratada suplementada con solución salina (proporción 1-10) y LPS a 10 µg/mL en muestras incubadas durante 60 minutos a 37 °C. Estas mezclas se centrifugaron y se analizó el plasma sobrenadante para los 14 biomarcadores inflamatorios mediante el uso de una matriz de citocinas de alta sensibilidad en un lector de Biochip Randox Invesitigator. Estos estudios se realizaron por duplicado y se tabularon en forma de una tabla y una figura. Como se muestra en las Figuras 8A-B, la suplementación de lipopolisacárido en una dilución 1:10 en sangre total da como resultado un aumento en la producción de citocinas inflamatorias IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL1-β, y MCP-1 en las condiciones especificadas. No se observaron cambios en IL2, IFNg ni ILlb. La Figura 8B muestra los cambios porcentuales en los diversos parámetros que demuestran claramente un aumento pronunciado en IL6, IL8, VEGF y TNFa.

Mediante el uso del mismo enfoque, se estudió, además, el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias en sangre total mediante el uso de entornos experimentales similares. En estos estudios, se estudió el efecto de la lubricina (,57 mg/mL) mediante la suplementación a la sangre total citratada extraída de voluntarios sanos normales. Las muestras se procesaron para determinar los niveles de citocinas inflamatorias junto con un control de solución salina en muestras incubadas durante 60 minutos. La sangre total se centrifugó para obtener plasma que se procesó para diversas citocinas inflamatorias mediante el uso de un ensayo de citocinas de alta sensibilidad. Como se muestra en las Figuras 9A-B, la suplementación con lubricina a 0,57 mg/ml en sangre total resultó en una disminución en la producción de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β, MCP-1, y EGF. La disminución más prominente se observó en VEGF, IL8, IL6 e IL10.

El efecto de la lubricina en la generación de citocinas inflamatorias mediadas por LPS se estudió mediante el uso de la tecnología Biochip Array. En estos estudios, se comparó LPS solo a 10 ng/ml y pre-suplementación de LPS a 10 ng/ml

seguido de suplementación con lubricina a 0,57 mg/ml en la sangre total citratada para la generación de diversas citocinas inflamatorias. Todas las muestras se incubaron durante 60 minutos y se centrifugaron para obtener plasma. Este plasma se analizó posteriormente mediante el uso de la matriz de biochips para citocinas inflamatorias. Se suplementó LPS a sangre total en una dilución 1:10. Como se muestra en las Figuras 10A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β, MCP-1 y EGF, aunque, como se discutió anteriormente, la presencia de LPS solo resultó en un aumento en la producción de cada una de estas citocinas. Como se muestra en la Figura 10B, la lubricina dio como resultado una disminución marcada en los niveles de EGF, IL10, VEGF, MCP1, ILlb y TNF. Estos datos sugieren que la suplementación de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediadas por LPS de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias mediada por TNF-α mediante el uso de la tecnología Biochip Array. Se usó TNF-α recombinante como desencadenante para generar citocinas inflamatorias en sangre total. Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de varias citocinas mediada por TNF-α. Se suplementó TNF-α solo a una concentración de 100 mg/ml a sangre total y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Se suplementó TNF-α a sangre total en una dilución 1:10. Se estudiaron los efectos moduladores de la lubricina sobre la generación de varias citocinas mediada por TNF-α al suplementar lubricina a 0,57 mg/ml en sangre total inmediatamente antes de la adición de TNF-α. Después de 60 minutos, se obtuvo plasma de la centrifugación y se analizó la citocina inflamatoria mediante el uso de matrices Randox Biochip. Como se muestra en las Figuras 11A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, IL-1β, y EGF, aunque el reto con TNF-α solo resultó en la producción de cada una de estas citocinas. La Figura 11B muestra que la lubricina disminuyó los niveles de citocinas en un intervalo de 10-100 %. Se encontró que la disminución más dramática de la expresión de citocinas que estimuladas por TNF-α es la reducción de IFN-γ y TNF-α estimulados (como la lubricina evidentemente interrumpió un ciclo de retroalimentación positiva de producción de TNF-α) en comparación con la estimulación en ausencia de lubricina. Estos datos sugieren que la administración de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediada por TNF-α de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Se estudió el efecto de la lubricina sobre la generación de citocinas inflamatorias mediadas por el factor de tejido recombinante (TF) mediante el uso de la tecnología Biochip Array. En estos estudios, se usó el factor tisular de la marca recombiplastina (Laboratorios IL) para desencadenar la generación de citocinas inflamatorias en sangre total humana. Se estudió el efecto de la lubricina a 0,57 mg/ml al suplementar este agente antes de la adición de factor tisular a la sangre total. El factor tisular solo sirvió como control positivo. Las muestras de sangre se centrifugaron y se recuperó el plasma. Este plasma se procesó luego para el perfil de citocinas inflamatorias en las matrices de Randox Biochip. TF se suplementó con sangre total en una dilución 1:10. Como se muestra en las Figuras 12A-B, la presencia de lubricina resultó en una disminución de IL-6, IL-8, VEGF, TNF-α, IL-1α, IL-1β, MCP-1 y EGF, aunque el reto con TF solo dio como resultado la producción de cada una de estas citocinas. Como se muestra en la Figura 12B, la lubricina produjo una disminución pronunciada en los niveles de TNF-α y de VEGF en muestras suplementadas con factor tisular. Estos datos sugieren que la administración de lubricina interfiere con la generación de citocinas inflamatorias mediadas por TF de manera significativa, lo que indica que la lubricina tiene propiedades antiinflamatorias.

Estos estudios muestran que la lubricina es capaz de inhibir la generación de diversas citocinas inflamatorias en la sangre total, que se suplementó con lipopolisacárido bacteriano (LPS), TNF-α y factor tisular. Todos estos agentes son mediadores de la inflamación. Por lo tanto, la lubricina es capaz de regular negativamente la generación de citocinas inflamatorias en una amplia variedad de mediadores.

Ejemplo 3. La lubricina reduce los niveles de citocinas proinflamatorias *in vivo*

Para determinar si la lubricina podría modular los niveles de citocinas proinflamatorias *in vivo,* se usó un modelo de rata. Nueve ratas se sometieron a cirugía para desestabilizar el menisco medial (cirugía DMM). Siete días después de la cirugía, cada rata recibió una dosis intrarticular única de lubricina de 200 µg/kg. Las ratas control recibieron una inyección de un volumen igual de solución salina. Los niveles de citocinas en las muestras de suero tomadas de los ratones de prueba se compararon con los ratones control que recibieron cirugía pero sin dosis de lubricina después de la cirugía. Las muestras se extrajeron 3 semanas después de la administración de la dosis de lubricina y se analizaron mediante el uso de la plataforma Luminex Multiplex. Los resultados se muestran en la Figura 13 donde se muestran los niveles medidos de EPO, IL-13, IL-10, IL-18, IL-1α, IL-2, MCSF, IL-1β, IL-4, IFN-γ, MIP-3α, GMCSF, IL-7, TNF-α, VEGF, MCP-1, IL-5, G-CSF, RANTES, IL-6, GRO, IL-17α, y IL-12p70. Los niveles de IL-18, MCSF, MCP-1, RANTES y GRO se redujeron en las ratas que recibieron lubricina en comparación con las ratas a las que se les inyectó solución salina sola. Más específicamente, esto muestra los amplios efectos antiinflamatorios de la lubricina, ya que este patrón de citocinas inflamatorias era distinto del perfil de los mediadores LPS y TF dominado por TNF-α/IL-6/IL-8 (que generalmente no estaban regulados positivamente en este modelo). No obstante, la lubricina fue capaz de reducir significativamente la producción de citocinas proinflamatorias *in vivo.*

Ejemplo 4. El efecto de la lubricina sobre los niveles de citocinas secretadas por sinoviocitos osteoartríticos humanos

Se obtuvieron células de líquido sinovial de pacientes normales y osteoartríticos (OA) y se purificaron con CD90+ después de un agotamiento de las células inmunitarias. Las células se colocaron en placas a 10 000 por pocillo y se suspendieron en medios que contenían DMEM, Hyclone FBS inactivado por calor (10 %) y Anti-Anti (1 %). Los ensayos contenían la suspensión celular (células + medios) a 180 µL y los ligandos a 20 µL para un volumen total de 200 µL. La lubricina recombinante (rhPRG4) se introdujo luego en las células a una concentración de 90 µg/mL y el control negativo fue PBS. La placa se incubó a 37 °C a 5 % de CO_2 durante 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes para el análisis de citocinas a través de la plataforma multiplex Luminex. Como se muestra en las Figuras 14A-B, las células normales no mostraron ningún cambio en la respuesta de las citocinas al comparar las condiciones de lubricina frente a PBS. Sin embargo, las células OA mostraron una regulación negativa en las citocinas FGF-2 e IL-IRa cuando se expusieron a lubricina. En consecuencia, en las células que ya exhiben una respuesta inflamatoria, tales como las células osteoartríticas probadas en la presente descripción, la administración de lubricina tiene la capacidad de reducir los niveles de citocinas proinflamatorias expresadas a partir de estas células.

Ejemplo 5. Tratamiento de la lesión cerebral

Durante el traumatismo craneoencefálico, con frecuencia hay contusiones del tejido cerebral y alteraciones de la integridad vascular que provocan hemorragia subaracnoidea y/o hematomas subdurales. En consecuencia, las neuronas se pierden, lo que lleva a una función cerebral comprometida. Además, en los CVA y TIA, se forman uno o más coágulos intravasculares, que bloquean el suministro de oxígeno y nutrientes a las células cerebrales, incluidas las neuronas, en un volumen del cerebro aguas abajo del bloqueo. Esto conduce, además, a la destrucción de las neuronas, lo cual compromete la función cerebral. La respuesta inmunitaria del cerebro a la lesión implica una mayor producción de mediadores proinflamatorios y el reclutamiento de leucocitos en el área de la lesión. Esto contribuye al daño neuronal en las regiones cerebrales periféricas al sitio de la lesión, denominada "penumbra", y exacerba el daño cerebral. La neuroinflamación es uno de los mecanismos clave de la lesión secundaria, y está bien establecido que la neuroinflamación postraumática contribuye significativamente al daño neuronal que ocurre después de una lesión cerebral traumática. Una forma de limitar dicho daño cerebral es mediante la administración de agentes durante un corto intervalo (horas) después de la lesión, lo cual reduce la neuroinflamación y el daño neuronal resultante. Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención, rhPRG4, conocido, además, como lubricina, puede administrarse sistémicamente a través de la vasculatura o durante la cirugía para aliviar la presión en el cerebro, como un medio para limitar el daño cerebral. El apoyo para tal tratamiento está respaldado por los resultados que se presentan a continuación.

Aproximadamente una hora después de una lesión cerebral traumática en ratas, mediante el uso de un modelo establecido de lesión cerebral que involucra un impacto cortical controlado, se administró rhPRG4 por vía intravenosa a ratas de prueba a una dosis aproximada de 2,5 mg/Kg. Se administró solución salina normal (0,9 % de NaCl) por vía intravenosa a las ratas control. Un día después, se recolectaron los cerebros y las muestras de la corteza cerebral que rodeaban la lesión postraumática se analizaron mediante transferencia Western. El análisis demostró que rhPRG4 redujo la producción postraumática de mediadores proinflamatorios en comparación con los controles.

La galectina 3, cuya expresión cerebral aumenta rápidamente y se mantiene en un nivel alto durante un período prolongado después de una lesión cerebral traumática, se reguló negativamente en un 74 %. Además, se observó una reducción del 60 % en la magnitud del influjo postraumático de monocitos en el parénquima cerebral lesionado en las ratas tratadas con rhPRG4, en comparación con las ratas tratadas con solución salina normal, y además, rhPRG4 atenuó sustancialmente (en un 94 %) la síntesis postraumática de la metaloproteinasa 9 de matriz e inhibió (en un 64 %) la conversión de la metaloproteinasa pro-matriz 2 a su forma enzimáticamente activa. Además, rhPRG4 redujo en un 80 % la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual se evaluó mediante el nivel de albúmina en el tejido cerebral traumatizado.

La inyección de rhPRG4 marcado con fluorescencia mostró que ingresa al parénquima cerebral en las áreas lesionadas del cerebro, mientras que está totalmente ausente de las áreas no dañadas del cerebro. Junto con los resultados de estudios *in vitro que* involucran la línea celular monocítica THP-1, estas observaciones indican que rhPRG4 limita la magnitud de la neuroinflamación postraumática al inhibir directamente la actividad quimiotáctica de las células inflamatorias invasoras, y al reducir la producción y señalización de mediadores proinflamatorios.

Por lo tanto, rhPRG4 se dirige selectivamente a las áreas lesionadas del cerebro, lo que reduce la probabilidad de efectos farmacológicos fuera del objetivo. La hPRG4 recombinante limita, con alta eficacia, la magnitud de la neuroinflamación causada por una lesión cerebral traumática, al reducir la producción postraumática de mediadores proinflamatorios y la entrada de células inflamatorias. Además, rhPRG4 exhibe una capacidad única para estabilizar la barrera hematoencefálica. El descubrimiento de esta novedosa propiedad de rhPRG4 es de gran importancia para el tratamiento de la lesión cerebral, ya que la disfunción de la barrera hematoencefálica observada en la lesión cerebral no solo contribuye a la muerte neuronal en la etapa aguda de la lesión, sino que conduce, además, a cambios neurodegenerativos progresivos en el cerebro lesionado y, en consecuencia, malos resultados neurológicos.

Ejemplo 6. Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal se caracteriza por un reclutamiento mediado por citocinas de células T activadas que produce daño oxidativo y un desgaste del epitelio intestinal. Se estima que del 25 % al 40 % de las personas con colitis ulcerativa (CU) o enfermedad de Crohn pueden progresar a cirugía, tal como una anastomosis anal de bolsa ileal o una proctocolectomía que extirpa porciones del colon y el recto. Las terapias comunes incluyen medicamentos antiinflamatorios de amplio espectro, tales como corticosteroides, anticuerpos anti-TNF o anticuerpos anti-integrina más específicos que tienen como objetivo prevenir la movilidad de las células T orientadas hacia el intestino. Ninguno de estos enfoques es adecuado para la terapia a largo plazo debido a los efectos secundarios graves, tales como las infecciones y el cáncer que acompañan a estos enfoques. Por el contrario, hPRG4 recombinante puede aplicarse selectivamente al intestino para reponer el glicocalix epitelial faltante y reducir localmente la expresión de citocinas. Una caracterización reciente del perfil de citocinas de la enfermedad inflamatoria intestinal predominantemente colónica reveló un aumento de TNF-α, GRO, CCL11 (eotaxina) en UC, IL-6 en Crohn e IL-8 en UC y Crohn versus controles (Korolkova y otros Clin Med Insights Gastroenerol 2015 6 de mayo; 8:29-44). Se ha demostrado que la lubricina reduce significativamente la expresión de estas citocinas. En una modalidad, rhPRG4 se administra mediante enema u oralmente, ya sea mediante sonda, irrigación de intestino entero, beber una solución o mediante píldoras encapsuladas (por ejemplo, encapsulación de micropartículas, encapsulación de nanopartículas, encapsulación de polímeros, etc.). A modo de ejemplo, una administración de enema de 100 ml a 4 L de rhPRG4 en concentraciones que van desde 10 µg/mL hasta 200 µg/mL, más preferiblemente volúmenes de 200 mL hasta 500 mL en concentraciones desde 50 µg/mL hasta 150 µg/mL, suspendido en una solución de sal tamponada aceptable por el intestino, repone el glicocalix, previene la localización de las células T y regula negativamente la expresión de citocinas en la localidad de administración de lubricina. La administración de rhPRG4 da como resultado una función de barrera epitelial mejorada, menos permeabilidad vascular, menos susceptibilidad a la actividad de la proteasa y una mejor absorción de nutrientes. En ciertas modalidades, se administra un citrato de magnesio u otro laxante hasta 24 horas antes de la administración de lubricina, seguido de un ayuno apropiado.

Ejemplo 7. Tratamiento de gota

Las ratas sometidas a inyección de cristales de urato de sodio se estudiaron como modelo de gota. 24 horas después de la administración de cristales de urato de sodio, las ratas desarrollaron dolor en las articulaciones. Dos ratas recibieron solución salina, mientras que otras dos ratas recibieron inyección de rhPRG4 24 horas después de la introducción de los cristales de urato. Estas ratas se estudiaron cada 12 horas mediante el uso del método de Von Frey. Este método determina la sensibilización del dolor aferente como resultado de la inflamación articular al sondear las patas de la extremidad afectada con un alambre de filamento delgado. Los datos en la Figura 15 muestran que las ratas que recibieron rhPRG4 tenían menos dolor que las ratas que recibieron placebo.

Si bien las modalidades preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en la presente descripción, será evidente para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan solo a modo de ejemplo. Ahora se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las modalidades preferidas de la misma y de las reivindicaciones. Estas y muchas otras variaciones y modalidades de la invención serán evidentes para un experto en la técnica tras una revisión de la descripción y de los ejemplos.

Listado de secuencias

<110> LUBRIS LLC

<120> USO DE PRG4 COMO UN AGENTE ANTIINFLAMATORIO

<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 versión 3.5

<210> 1
<211> 1404
<212> PRT
<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
145                 150                 155                 160

Ser Glu Asn Gln Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Ser Thr Thr Pro Lys Glu Pro Thr Pro
        355                 360                 365

Thr Thr Ile Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
    370                 375                 380

Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
385                 390                 395                 400
```

```
Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
                405                 410                 415

Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro
            420                 425                 430

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
        435                 440                 445

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Thr Pro Thr Thr Pro
    450                 455                 460

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys
465                 470                 475                 480

Glu Pro Ala Pro Thr Ala Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys
                485                 490                 495

Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
            500                 505                 510

Glu Pro Ser Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
        515                 520                 525

Ser Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser
    530                 535                 540

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ser Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro
545                 550                 555                 560

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro
                565                 570                 575

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
            580                 585                 590

Ala Pro Thr Thr Thr Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
        595                 600                 605

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Leu
    610                 615                 620

Thr Pro Thr Thr Pro Glu Lys Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Lys Pro
625                 630                 635                 640

Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro
                645                 650                 655
```

```
Thr Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Ala Ala
            660                 665                 670

Ala Pro Asn Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
        675                 680                 685

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr
    690                 695                 700

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Leu Lys Glu Pro
705                 710                 715                 720

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys Glu Leu Ala Pro Thr
                725                 730                 735

Thr Thr Lys Glu Pro Thr Ser Thr Thr Cys Asp Lys Pro Ala Pro Thr
            740                 745                 750

Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
        755                 760                 765

Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr
    770                 775                 780

Thr Leu Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys
785                 790                 795                 800

Glu Leu Ala Pro Thr Thr Thr Lys Gly Pro Thr Ser Thr Thr Ser Asp
                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
    1160                1165                1170

Ser Pro  Phe Ser Pro Pro Ser  Pro Ala Arg Arg Ile  Thr Glu Val
    1175                1180                1185

Trp Gly  Ile Pro Ser Pro Ile  Asp Thr Val Phe Thr  Arg Cys Asn
    1190                1195                1200

Cys Glu  Gly Lys Thr Phe Phe  Phe Lys Asp Ser Gln  Tyr Trp Arg
    1205                1210                1215

Phe Thr  Asn Asp Ile Lys Asp  Ala Gly Tyr Pro Lys  Pro Ile Phe
    1220                1225                1230

Lys Gly  Phe Gly Gly Leu Thr  Gly Gln Ile Val Ala  Ala Leu Ser
    1235                1240                1245

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp  Tyr Asn Cys Pro
    1400
```

<210> 2
<211> 5041

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

gcggccgcga ctattcggta cctgaaaaca acgatggcat ggaaaacact tcccatttac 60

ctgttgttgc tgctgtctgt tttcgtgatt cagcaagttt catctcaaga tttatcaagc 120

tgtgcaggga gatgtgggga agggtattct 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

aaatcaacaa ccaaacgttc acccaaacca ccaaacaaga agaagactaa gaaagttata 480

gaatcagagg aaataacaga agaacattct gtttctgaaa atcaagagtc ctcctcctcc 540

tcctcctctt cctcttcttc ttcaacaatt tggaaaatca agtcttccaa aaattcagct 600

gctaatagag aattacagaa gaaactcaaa gtaaaagata acaagaagaa cagaactaaa 660

aagaaaccta cccccaaacc accagttgta gatgaagctg gaagtggatt ggacaatggt 720

gacttcaagg tcacaactcc tgacacgtct accacccaac acaataaagt cagcacatct 780

cccaagatca 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

cccacgccca ccactcccaa ggagcctgca tctaccacac ccaaagagcc cacacctacc 1140

accatcaagt ctgcacccac cacccccaag gagcctgcac ccaccaccac caagtctgca 1200

cccaccactc ccaaggagcc tgcacccacc accaccaagg agcctgcacc caccactccc 1260

aaggagcctg cacccaccac caccaaggag cctgcaccca ccaccaccaa gtctgcaccc 1320

accactccca aggagcctgc acccaccacc cccaagaagc ctgccccaac taccccaag 1380

gagcctgcac ccaccactcc caaggagcct acacccacca ctcccaagga gcctgcaccc 1440

accaccaagg agcctgcacc caccactccc aaagagcctg cacccactgc ccccaagaag 1500

cctgccccaa ctacccccaa ggagcctgca cccaccactc ccaaggagcc tgcacccacc 1560

accaccaagg agccttcacc caccactccc aaggagcctg cacccaccac caccaagtct 1620

gcacccacca ctaccaagga gcctgcaccc accactacca agtctgcacc caccactccc 1680

aaggagcctt cacccaccac caccaaggag cctgcaccca ccactcccaa ggagcctgca 1740

cccaccaccc ccaagaagcc tgccccaact acccccaagg agcctgcacc caccactccc 1800

aaggaacctg cacccaccac caccaagaag cctgcaccca ccgctcccaa agagcctgcc 1860

ccaactaccc ccaaggagac tgcacccacc acccccaaga agctcacgcc caccaccccc 1920

gagaagctcg cacccaccac ccctgagaag cccgcaccca ccacccctga ggagctcgca 1980

cccaccaccc ctgaggagcc cacacccacc acccctgagg agcctgctcc caccactccc 2040

aaggcagcgg ctcccaacac ccctaaggag cctgctccaa ctacccctaa ggagcctgct 2100

ccaactaccc ctaaggagcc tgctccaact acccctaagg agactgctcc aactacccct 2160

aaagggactg ctccaactac cctcaaggaa cctgcaccca ctactcccaa gaagcctgcc 2220

cccaaggagc ttgcacccac caccaccaag gagcccacat ccaccacctc tgacaagccc 2280

gctccaacta cccctaaggg gactgctcca actaccccta aggagcctgc tccaactacc 2340

cctaaggagc ctgctccaac taccctaag gggactgctc caactaccct caaggaacct 2400

gcacccacta ctcccaagaa gcctgccccc aaggagcttg cacccaccac caccaagggg 2460

cccacatcca ccacctctga caagcctgct ccaactacac ctaaggagac tgctccaact 2520

acccccaagg agcctgcacc cactaccccc aagaagcctg ctccaactac tcctgagaca 2580

cctcctccaa ccacttcaga ggtctctact ccaactacca ccaaggagcc taccactatc 2640

cacaaaagcc ctgatgaatc aactcctgag ctttctgcag aacccacacc aaaagctctt 2700

gaaaacagtc ccaaggaacc tggtgtacct acaactaaga ctcctgcagc gactaaacct 2760

gaaatgacta caacagctaa agacaagaca acagaaagag acttacgtac tacacctgaa 2820

actacaactg ctgcacctaa gatgacaaaa gagacagcaa ctacaacaga aaaaactacc 2880

gaatccaaaa 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 agcacccaaa 3120

aaacccactt ctaccaaaaa gccaaaaaca atgcctagag tgagaaaacc aaagacgaca 3180

ccaactcccc gcaagatgac atcaacaatg ccagaattga accctacctc aagaatagca 3240

gaagccatgc tccaaaccac caccagacct aaccaaactc caaactccaa actagttgaa 3300

gtaaatccaa agagtgaaga tgcaggtggt gctgaaggag aaacacctca tatgcttctc 3360

aggccccatg tgttcatgcc tgaagttact cccgacatgg attacttacc gagagtaccc 3420

aatcaaggca ttatcatcaa tcccatgctt tccgatgaga ccaatatatg caatggtaag 3480

ccagtagatg gactgactac tttgcgcaat gggacattag ttgcattccg aggtcattat 3540

ttctggatgc taagtccatt cagtccacca tctccagctc gcagaattac tgaagtttgg 3600

ggtattcctt cccccattga tactgttttt actaggtgca actgtgaagg aaaaactttc 3660

ttctttaagg attctcagta ctggcgtttt accaatgata taaaagatgc agggtacccc 3720

aaaccaattt tcaaaggatt tggaggacta actggacaaa tagtggcagc gctttcaaca 3780

gctaaatata agaactggcc tgaatctgtg tatttttca agagaggtgg cagcattcag 3840

cagtatattt ataaacagga acctgtacag aagtgccctg gaagaaggcc tgctctaaat 3900

tatccagtgt atggagaaat gacacaggtt aggagacgtc gctttgaacg tgctatagga 3960

ccttctcaaa cacacaccat cagaattcaa tattcacctg ccagactggc ttatcaagac 4020

aaaggtgtcc ttcataatga agttaaagtg agtatactgt ggagaggact tccaaatgtg 4080

gttacctcag ctatatcact gcccaacatc agaaaacctg acggctatga ttactatgcc 4140

ttttctaaag atcaatacta taacattgat gtgcctagta gaacagcaag agcaattact 4200

actcgttctg ggcagacctt atccaaagtc tggtacaact gtccttagac tgatgagcaa 4260

aggaggagtc aactaatgaa gaaatgaata ataaattttg acactgaaaa acattttatt 4320

aataaagaat attgacatga gtataccagt ttatatataa aaatgttttt aaacttgaca 4380

atcattacac taaaacagat ttgataatct tattcacagt tgttattgtt tacagaccat 4440

ttaattaata tttcctctgt ttattcctcc tctccctccc attgcatggc tcacacctgt 4500

aaaagaaaaa agaatcaaat tgaatatatc ttttaagaat tcaaaactag tgtattcact 4560

taccctagtt cattataaaa aatatctagg cattgtggat ataaaactgt tgggtattct 4620

acaacttcaa tggaaattat tacaagcaga ttaatccctc tttttgtgac acaagtacaa 4680

tctaaaagtt atattggaaa acatggaaat attaaaattt tacactttta ctagctaaaa 4740

cataatcaca aagctttatc gtgttgtata aaaaaattaa caatataatg gcaataggta 4800

gagatacaac aaatgaatat aacactataa cacttcatat tttccaaatc ttaatttgga 4860

tttaaggaag aaatcaataa atataaaata taagcacata tttattatat atctaaggta 4920

tacaaatctg tctacatgaa gtttacagat tggtaaatat cacctgctca acatgtaatt 4980

atttaataaa actttggaac attaaaaaaa taaattggag gcttaaaaaa aaaaaaaaaa 5040

a 5041

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

<400> 3

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. PRG4 para su uso en un método para reducir o inhibir una respuesta inflamatoria en un paciente con lesión cerebral.

2. PRG4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el PRG4 se administra sistémicamente al paciente.

3. PRG4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la administración es intravenosa, por inhalación, intramuscular, subcutánea, oral, rectal, bucal o sublingual.

4. PRG4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el PRG4 se administra localmente al paciente.

5. PRG4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el PRG4 se administra al cerebro por vía tópica durante la cirugía o por inyección.

6. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PRG4 es PRG4 humano exógeno.

7. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PRG4 es PRG4 humano recombinante.

8. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PRG4 tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1 menos la secuencia de señal.

9. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde PRG4 se administra en una cantidad insuficiente para proporcionar lubricación límite en el paciente.

10. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde PRG4 se administra en una cantidad que varía desde 0,1 µg/kg - 4000 µg/kg.

11. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde PRG4 se administra localmente para proporcionar un recubrimiento de PRG4 a partir de una solución de PRG4.

12. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la reducción o inhibición de la respuesta inflamatoria puede medirse por el nivel de producción de una citocina proinflamatoria en el paciente, opcionalmente en donde la citocina proinflamatoria se selecciona del grupo que consiste en IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17α, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, TNF-α, TNF-β (linfotoxina-α), linfotoxina -β, CXC31L (Fractalquina), 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, MIP3α, MG-CSF y GCSF.

13. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lesión cerebral es una lesión cerebral traumática.

14. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para reducir o inhibir el daño neuronal en regiones cerebrales periféricas al sitio de la lesión

15. PRG4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente es un ser humano.

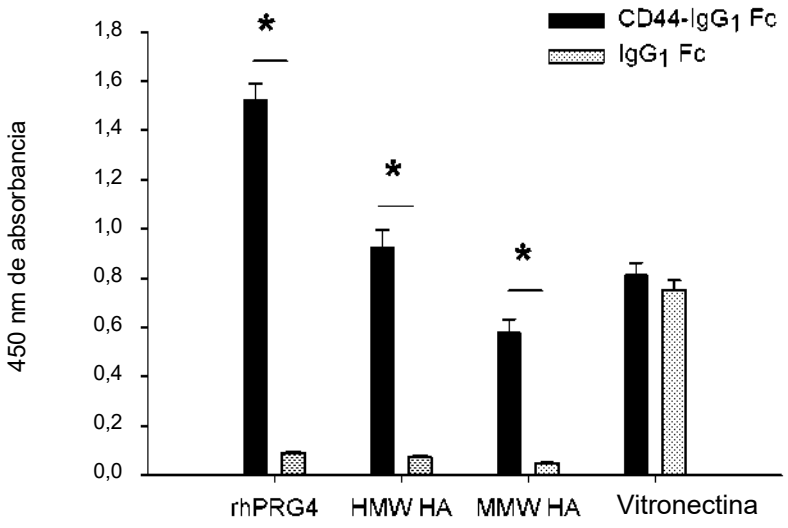


FIGURA 1A

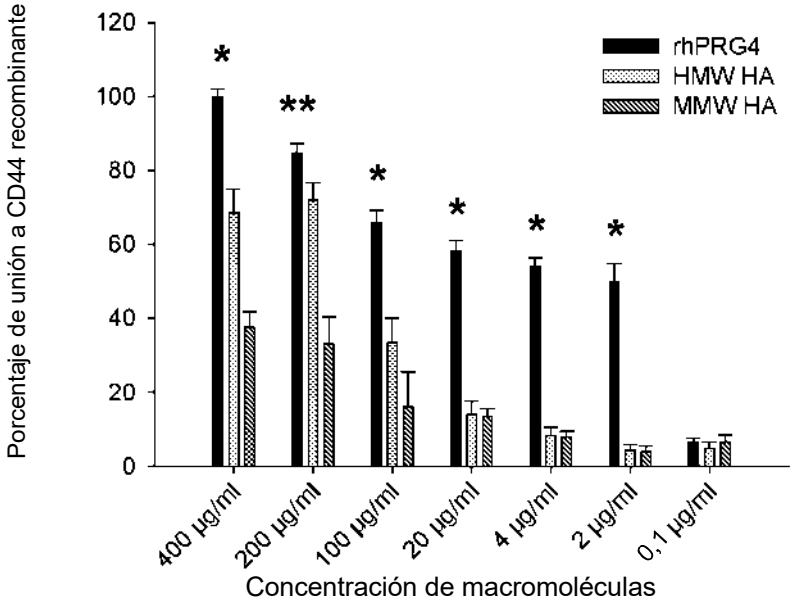


FIGURA 1B

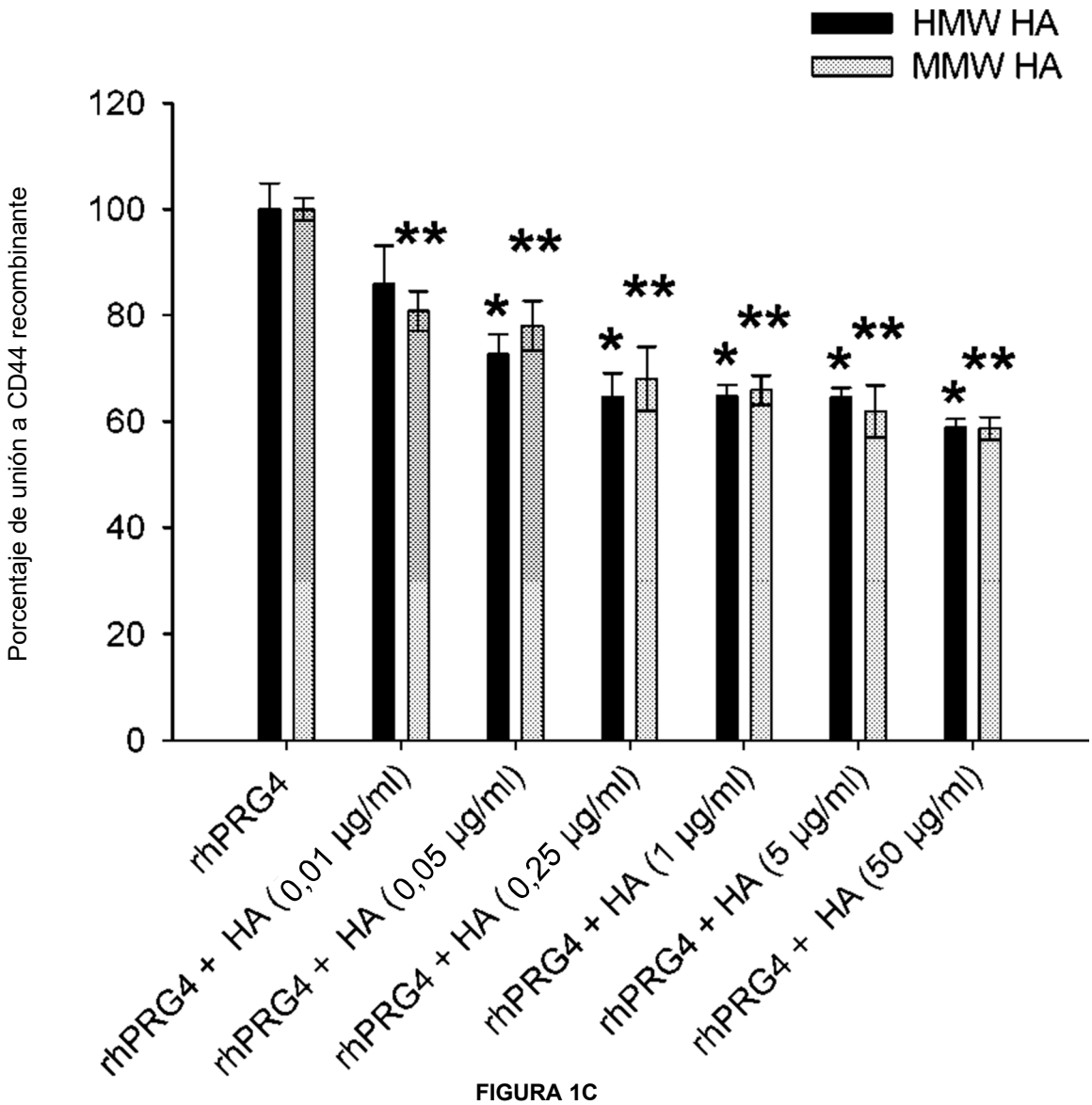

HMW HA
MMW HA
Porcentaje de unión a CD44 recombinante
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
**
*
**
*
**
*
**
rhPRG4
rhPRG4 + HA (0,01 µg/ml)
rhPRG4 + HA (0,05 µg/ml)
rhPRG4 + HA (0,25 µg/ml)
rhPRG4 + HA (1 µg/ml)
rhPRG4 + HA (5 µg/ml)
rhPRG4 + HA (50 µg/ml)

FIGURA 1C

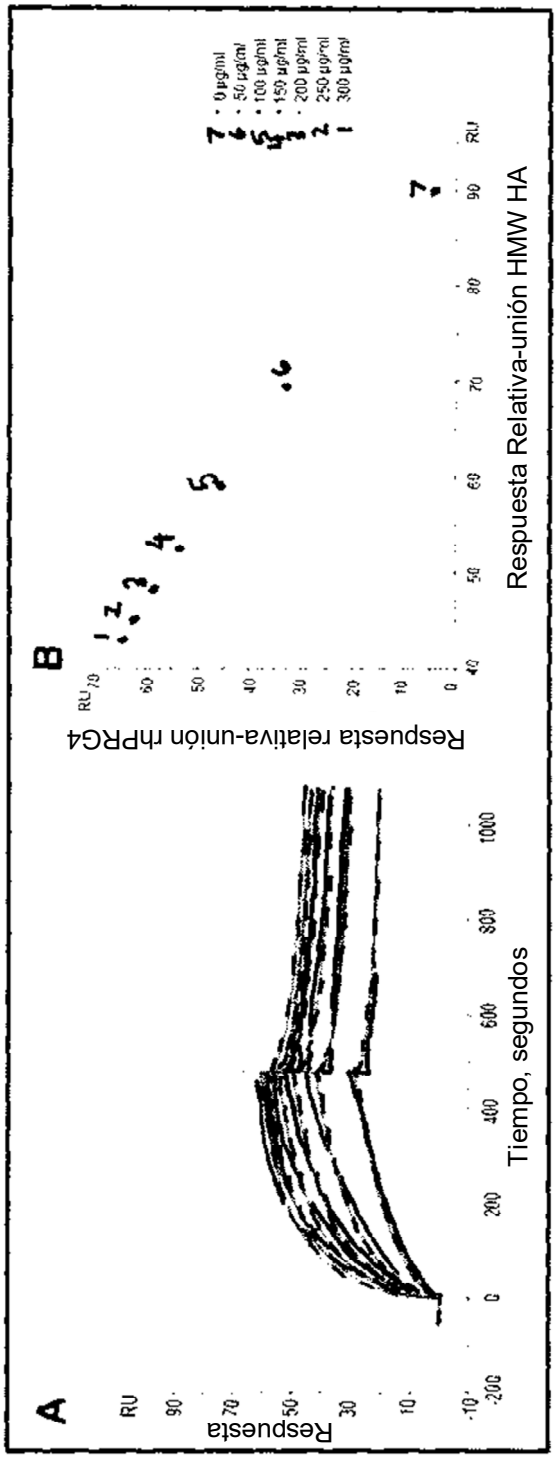


FIGURA 2A

FIGURA 2B

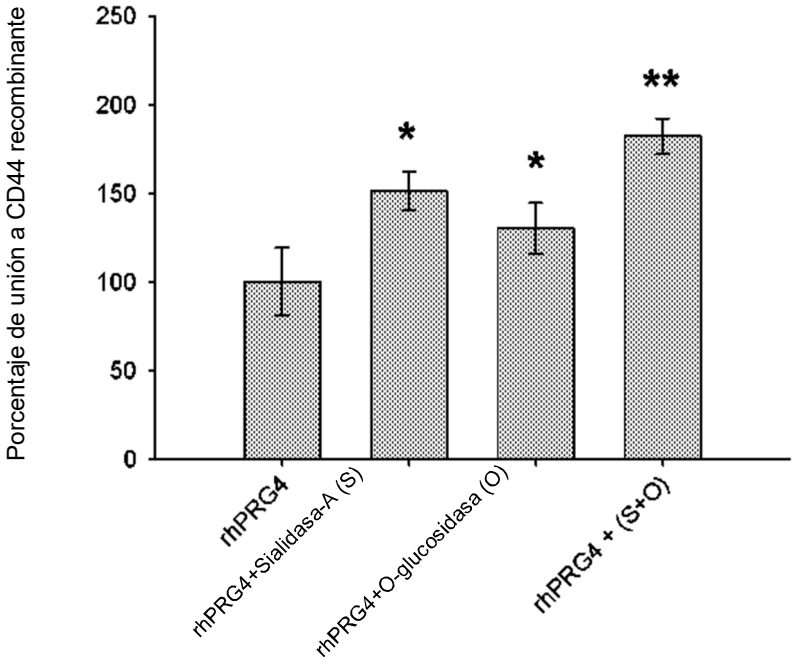


FIGURA 3A

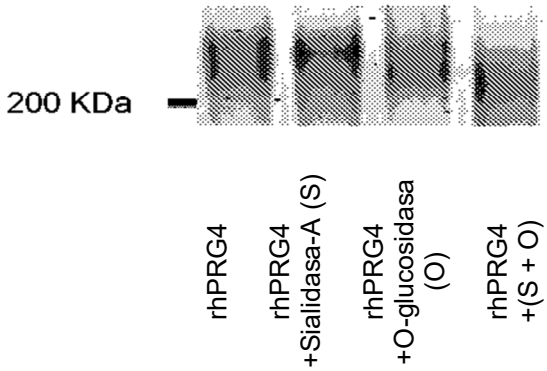


FIGURA 3B

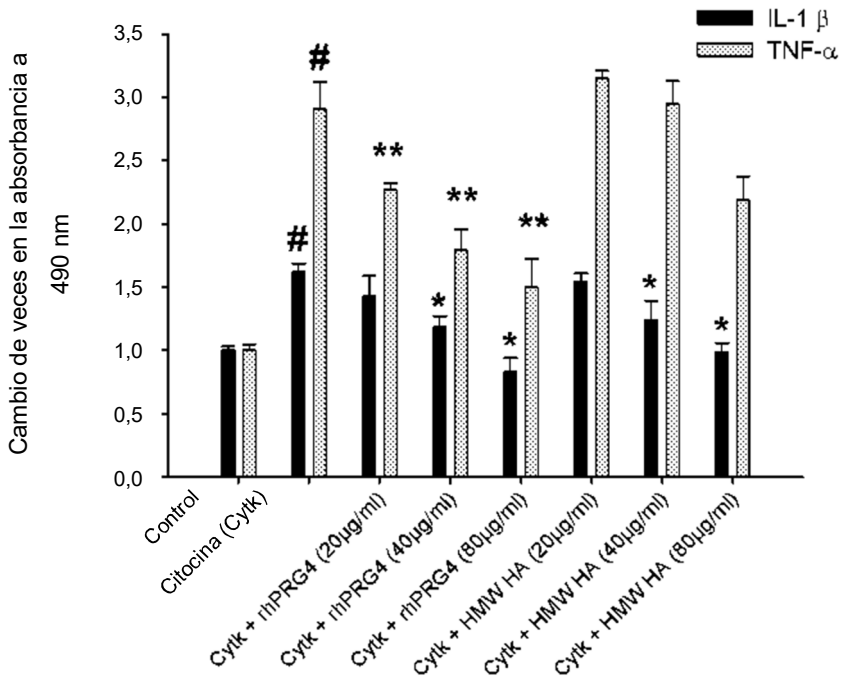


FIGURA 4A

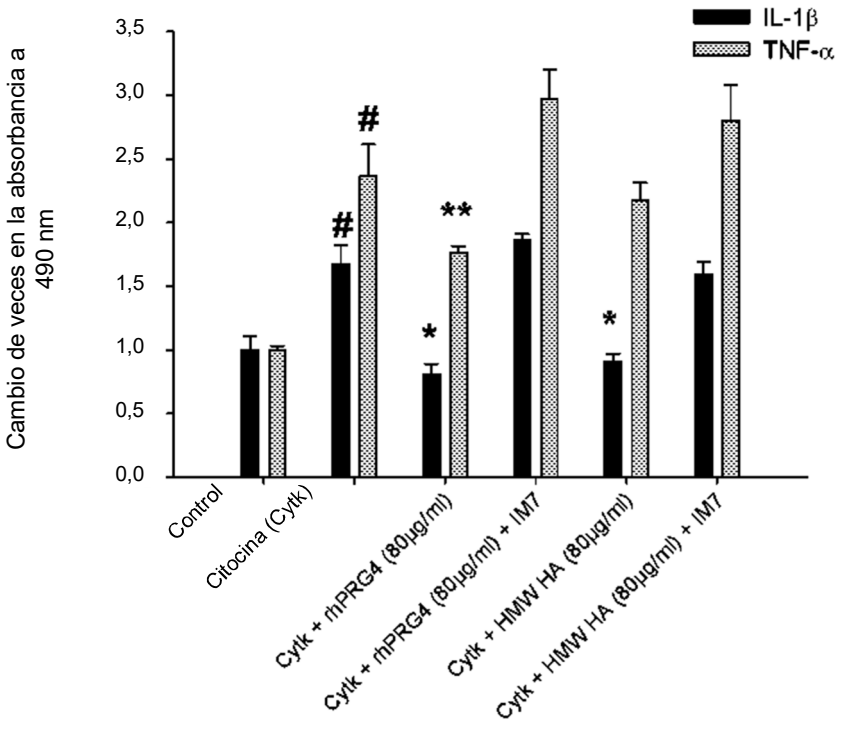


FIGURA 4B

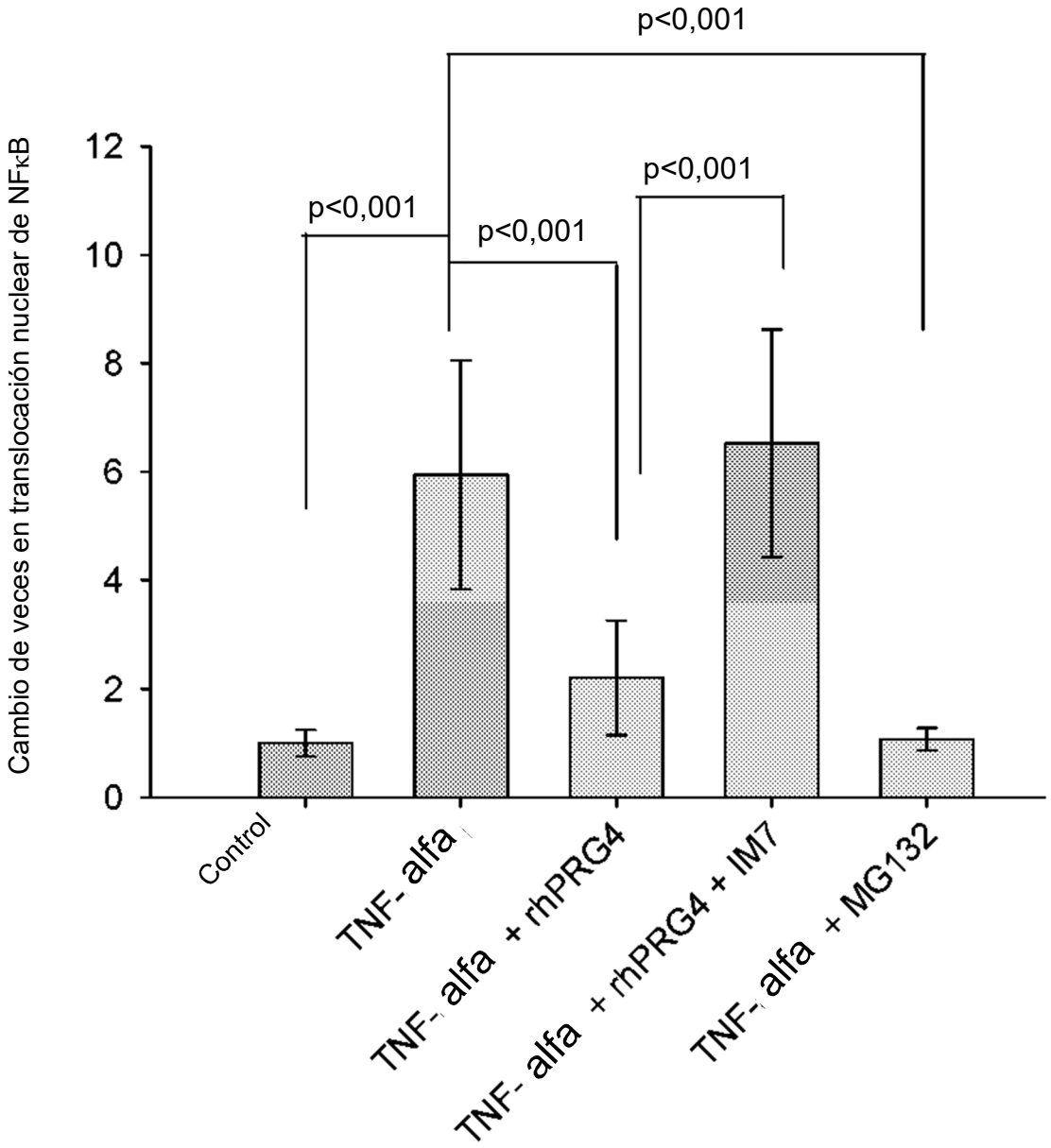
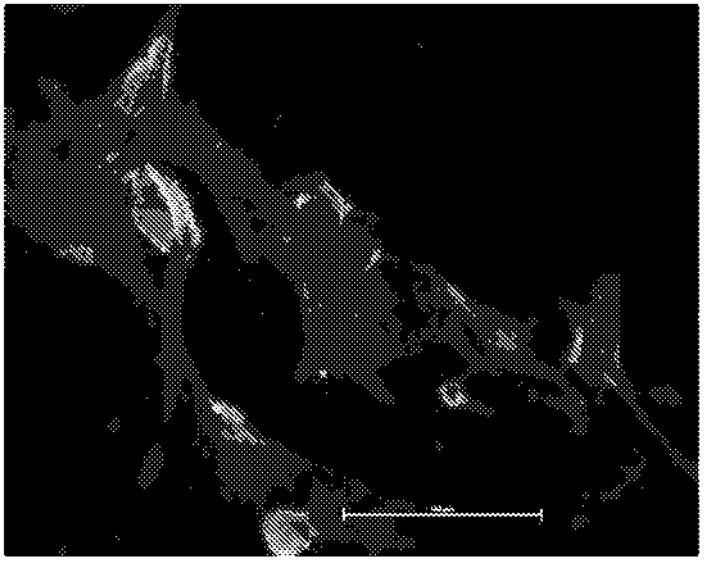

p<0,001
p<0,001
p<0,001
p<0,001
Cambio de veces en translocación nuclear de NFκB
12
10
8
6
4
2
0
Control
TNF- alfa
TNF- alfa + rhPRG4
TNF- alfa + rhPRG4 + IM7
TNF- alfa + MG132

FIGURA 4C

FIGURA 5A

Sinoviocitos Prg4-/-



Sinoviocitos Prg4+/+

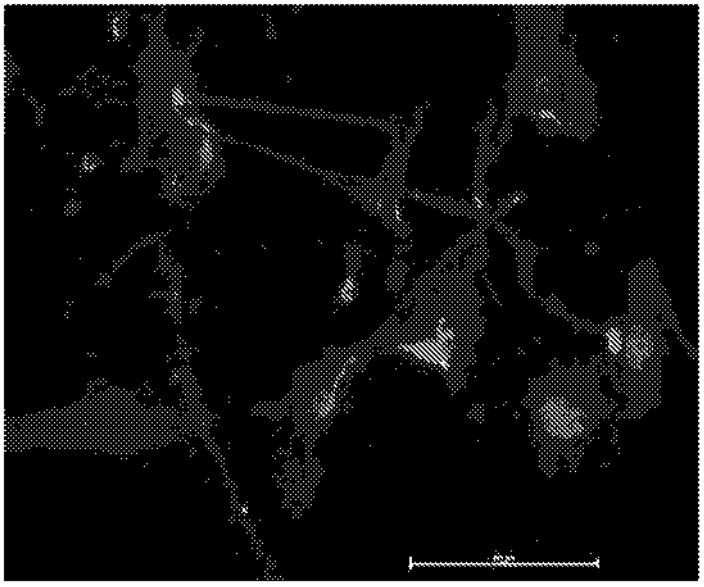


FIGURA 5B

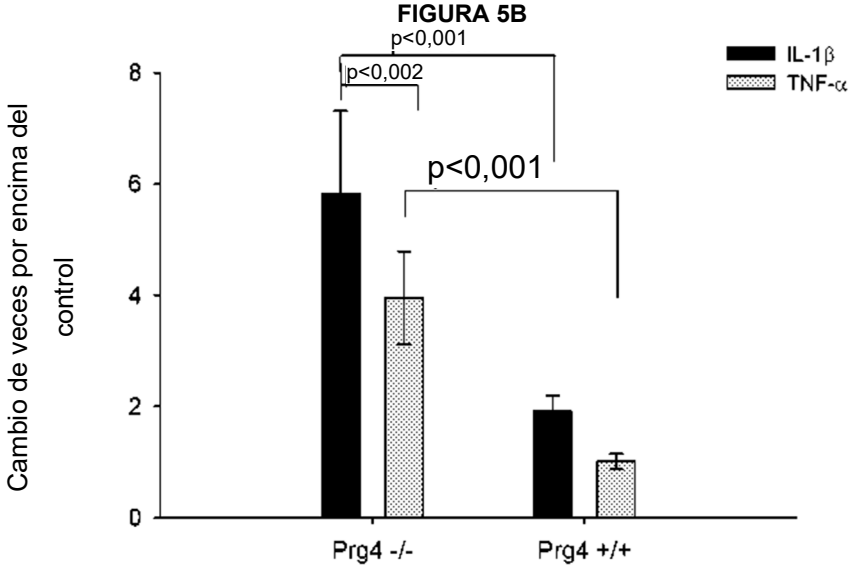


FIGURA 5C

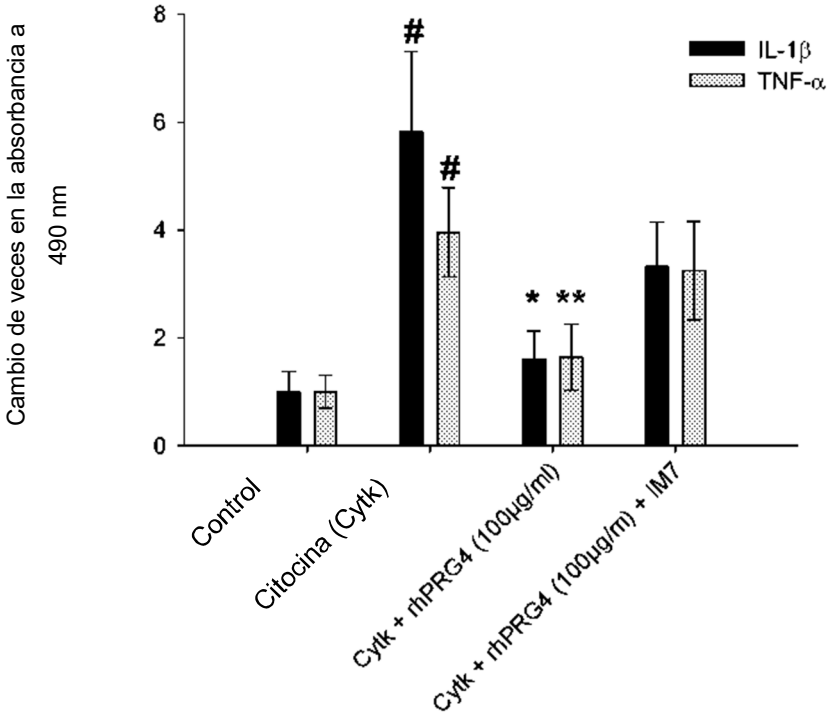


FIGURA 6

SEQ ID NO: 1, LONGITUD: 1404, ORGANISMO: Homo sapiens, Núm. de Acceso UNIPROT Q92954:

MAWKTLPIYL LLLLSVFVIQ QVSSQDLSSC AGRCGEGYSR DATCNCDYNC QHYMECCPDF
KRVCTAELSC KGRCFESFER GRECDCDAQC KKYDKCCPDY ESFCAEVHNP TSPPSSKKAP
PPSGASQTIK STTKRSPKPP NKKKTKKVIE SEEITEEHSV SENQESSSSS SSSSSSSTIR
KIKSSKNSAA NRELQKKLKV KDNKKNRTKK KPTPKPPVVD EAGSGLDNGD FKVTTPDTST
TQHNKVSTSP KITTAKPINP RPSLPPNSDT SKETSLTVNK ETTVETKETT TTNKQTSTDG
KEKTTSAKET QSIEKTSAKD LAPTSKVLAK PTPKAETTTK GPALTTPKEP TPTTPKEPAS
TTPKEPTPTT IKSAPTTPKE PAPTTTKSAP TTPKEPAPTT TKEPAPTTPK EPAPTTTKEP
APTTTKSAPT TPKEPAPTTP KKPAPTTPKE PAPTTPKEPT PTTPKEPAPT TKEPAPTTPK
EPAPTAPKKP APTTPKEPAP TTPKEPAPTT TKEPSPTTPK EPAPTTTKSA PTTTKEPAPT
TTKSAPTTPK EPSPTTTKEP APTTPKEPAP TTPKKPAPTT PKEPAPTTPK EPAPTTTKKP
APTTPKEPAP TTPKETAPTT PKKLTPTTPE KLAPTTPEKP APTTPEELAP TTPEEPTPTT
PEEPAPTTPK AAAPNTPKEP APTTPKEPAP TTPKEPAPTT PKETAPTTPK GTAPTTLKEP
APTTPKKPAP KELAPTTTKE PTSTTCDKPA PTTPKGTAPT TPKEPAPTTP KEPAPTTPKG
TAPTTLKEPA PTTPKKPAPK ELAPTTTKGP TSTTSDKPAP TTPKETAPTT PKEPAPTTPK
KPAPTTPETP PPTTSEVSTP TTTKEPTTIH KSPDESTPEL SAEPTPKALE NSPKEPGVPT
TKTPAATKPE MTTTAKDKTT ERDLRTTPET TTAAPKMTKE TATTTEKTTE SKITATTTQV
TSTTTQDTTP FKITTLKTTT LAPKVTTTKK TITTTEIMNK PEETAKPKDR ATNSKATTPK
PQKPTKAPKK PTSTKKPKTM PRVRKPKTTP TPRKMTSTMP ELNPTSRIAE AMLQTTTRPN
QTPNSKLVEV NPKSEDAGGA EGETPHMLLR PHVFMPEVTP DMDYLPRVPN QGIIINPMLS
DETNICNGKP VDGLTTLRNG TLVAFRGHYF WMLSPFSPPS PARRITEVWG IPSPIDTVFT
RCNCEGKTFF FKDSQYWRFT NDIKDAGYPK PIFKGFGGLT GQIVAALSTA KYKNWPESVY
FFKRGGSIQQ YIYKQEPVQK CPGRRPALNY PVYGETTQVR RRRFERAIGP SQTHTIRIQY
SPARLAYQDK GVLHNEVKVS ILWRGLPNVV TSAISLPNIR KPDGYDYYAF SKDQYYNIDV
PSRTARAITT RSGQTLSKVW YNCP

FIGURA 7

SEQ ID NO: 2 LONGITUD: 5041, TIPO: ADN, ORGANISMO: Homo sapiens,
Núm. de Acceso GenBank U70136.1:

GCGGCCGCGACTATTCGGTACCTGAAAACAACGATGGCATGGAAAACACTTCCCATTTACCTGT
TGTTGCTGCTGTCTGTTTTCGTGATTCAGCAAGTTTCATCTCAAGATTTATCAAGCTGTGCAGG
GAGATGTGGGGAAGGGTATTCTAGAGATGCCACCTGCAACTGTGATTATAACTGTCAACACTAC
ATGGAGTGCTGCCCTGATTTCAAGAGAGTCTGCACTGCGGAGCTTTCCTGTAAAGGCCGCTGCT
TTGAGTCCTTCGAGAGAGGGAGGGAGTGTGACTGCGACGCCCAATGTAAGAAGTATGACAAGTG
CTGTCCCGATTATGAGAGTTTCTGTGCAGAAGTGCATAATCCCACATCACCACCATCTTCAAAG
AAAGCACCTCCACCTTCAGGAGCATCTCAAACCATCAAATCAACAACCAAACGTTCACCCAAAC
CACCAAACAAGAAGAAGACTAAGAAAGTTATAGAATCAGAGGAAATAACAGAAGAACATTCTGT
TTCTGAAAATCAAGAGTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCTTCCTCTTCTTCTTCAACAATTTGGAAA
ATCAAGTCTTCCAAAAATTCAGCTGCTAATAGAGAATTACAGAAGAAACTCAAAGTAAAAGATA
ACAAGAAGAACAGAACTAAAAAGAAACCTACCCCCAAACCACCAGTTGTAGATGAAGCTGGAAG
TGGATTGGACAATGGTGACTTCAAGGTCACAACTCCTGACACGTCTACCACCCAACACAATAAA
GTCAGCACATCTCCCAAGATCACAACAGCAAAACCAATAAATCCCAGACCCAGTCTTCCACCTA
ATTCTGATACATCTAAAGAGACGTCTTTGACAGTGAATAAAGAGACAACAGTTGAAACTAAAGA
AACTACTACAACAAATAAACAGACTTCAACTGATGGAAAAGAGAAGACTACTTCCGCTAAAGAG
ACACAAAGTATAGAGAAAACATCTGCTAAAGATTTAGCACCCACATCTAAAGTGCTGGCTAAAC
CTACACCCAAAGCTGAAACTACAACCAAAGGCCCTGCTCTCACCACTCCCAAGGAGCCCACGCC
CACCACTCCCAAGGAGCCTGCATCTACCACACCCAAAGAGCCCACACCTACCACCATCAAGTCT
GCACCCACCACCCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCACTCCCAAGG
AGCCTGCACCCACCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCACTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCAC
CACCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCACTCCCAAGGAGCCTGCACCC
ACCACCCCCAAGAAGCCTGCCCCAACTACCCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACTCCCAAGGAGC
CTACACCCACCACTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCACTCCCAA
AGAGCCTGCACCCACTGCCCCCAAGAAGCCTGCCCCAACTACCCCCAAGGAGCCTGCACCCACC
ACTCCCAAGGAGCCTGCACCCACCACCACCAAGGAGCCTTCACCCACCACTCCCAAGGAGCCTG
CACCCACCACCACCAAGTCTGCACCCACCACTACCAAGGAGCCTGCACCCACCACTACCAAGTC

TGCACCCACCACTCCCAAGGAGCCTTCACCCACCACCACCAAGGAGCCTGCACCCACCACTCCC
AAGGAGCCTGCACCCACCACCCCCAAGAAGCCTGCCCCAACTACCCCCAAGGAGCCTGCACCCA
CCACTCCCAAGGAACCTGCACCCACCACCACCAAGAAGCCTGCACCCACCGCTCCCAAAGAGCC
TGCCCCAACTACCCCCAAGGAGACTGCACCCACCACCCCCAAGAAGCTCACGCCCACCACCCCC
GAGAAGCTCGCACCCACCACCCCTGAGAAGCCCGCACCCACCACCCCTGAGGAGCTCGCACCCA
CCACCCCTGAGGAGCCCACACCCACCACCCCTGAGGAGCCTGCTCCCACCACTCCCAAGGCAGC
GGCTCCCAACACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACTACCCCT
AAGGAGCCTGCTCCAACTACCCCTAAGGAGACTGCTCCAACTACCCCTAAAGGGACTGCTCCAA
CTACCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCCAAGGAGCTTGCACCCAC
CACCACCAAGGAGCCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCCGCTCCAACTACCCCTAAGGGGACT
GCTCCAACTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACTACCCCTA
AGGGGACTGCTCCAACTACCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCCAA
GGAGCTTGCACCCACCACCACCAAGGGGCCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCTGCTCCAACT
ACACCTAAGGAGACTGCTCCAACTACCCCCAAGGAGCCTGCACCCACTACCCCCAAGAAGCCTG
CTCCAACTACTCCTGAGACACCTCCTCCAACCACTTCAGAGGTCTCTACTCCAACTACCACCAA
GGAGCCTACCACTATCCACAAAAGCCCTGATGAATCAACTCCTGAGCTTTCTGCAGAACCCACA
CCAAAAGCTCTTGAAAACAGTCCCAAGGAACCTGGTGTACCTACAACTAAGACTCCTGCAGCGA
CTAAACCTGAAATGACTACAACAGCTAAAGACAAGACAACAGAAAGAGACTTACGTACTACACC
TGAAACTACAACTGCTGCACCTAAGATGACAAAAGAGACAGCAACTACAACAGAAAAAACTACC
GAATCCAAAATAACAGCTACAACCACACAAGTAACATCTACCACAACTCAAGATACCACACCAT
TCAAAATTACTACTCTTAAAACAACTACTCTTGCACCCAAAGTAACTACAACAAAAAAGACAAT
TACTACCACTGAGATTATGAACAAACCTGAAGAAACAGCTAAACCAAAAGACAGAGCTACTAAT
TCTAAAGCGACAACTCCTAAACCTCAAAAGCCAACCAAAGCACCCAAAAAACCCACTTCTACCA
AAAAGCCAAAAACAATGCCTAGAGTGAGAAAACCAAAGACGACACCAACTCCCCGCAAGATGAC
ATCAACAATGCCAGAATTGAACCCTACCTCAAGAATAGCAGAAGCCATGCTCCAAACCACCACC
AGACCTAACCAAACTCCAAACTCCAAACTAGTTGAAGTAAATCCAAAGAGTGAAGATGCAGGTG
GTGCTGAAGGAGAAACACCTCATATGCTTCTCAGGCCCCATGTGTTCATGCCTGAAGTTACTCC
CGACATGGATTACTTACCGAGAGTACCCAATCAAGGCATTATCATCAATCCCATGCTTTCCGAT
GAGACCAATATATGCAATGGTAAGCCAGTAGATGGACTGACTACTTTGCGCAATGGGACATTAG
TTGCATTCCGAGGTCATTATTTCTGGATGCTAAGTCCATTCAGTCCACCATCTCCAGCTCGCAG

AATTACTGAAGTTTGGGGTATTCCTTCCCCCATTGATACTGTTTTTACTAGGTGCAACTGTGAA
GGAAAAACTTTCTTCTTTAAGGATTCTCAGTACTGGCGTTTTACCAATGATATAAAAGATGCAG
GGTACCCCAAACCAATTTTCAAAGGATTTGGAGGACTAACTGGACAAATAGTGGCAGCGCTTTC
AACAGCTAAATATAAGAACTGGCCTGAATCTGTGTATTTTTTCAAGAGAGGTGGCAGCATTCAG
CAGTATATTTATAAACAGGAACCTGTACAGAAGTGCCCTGGAAGAAGGCCTGCTCTAAATTATC
CAGTGTATGGAGAAATGACACAGGTTAGGAGACGTCGCTTTGAACGTGCTATAGGACCTTCTCA
AACACACACCATCAGAATTCAATATTCACCTGCCAGACTGGCTTATCAAGACAAAGGTGTCCTT
CATAATGAAGTTAAAGTGAGTATACTGTGGAGAGGACTTCCAAATGTGGTTACCTCAGCTATAT
CACTGCCCAACATCAGAAAACCTGACGGCTATGATTACTATGCCTTTTCTAAAGATCAATACTA
TAACATTGATGTGCCTAGTAGAACAGCAAGAGCAATTACTACTCGTTCTGGGCAGACCTTATCC
AAAGTCTGGTACAACTGTCCTTAGACTGATGAGCAAAGGAGGAGTCAACTAATGAAGAAATGAA
TAATAAATTTTGACACTGAAAAACATTTTATTAATAAAGAATATTGACATGAGTATACCAGTTT
ATATATAAAAATGTTTTTAAACTTGACAATCATTACACTAAAACAGATTTGATAATCTTATTCA
CAGTTGTTATTGTTTACAGACCATTTAATTAATATTTCCTCTGTTTATTCCTCCTCTCCCTCCC
ATTGCATGGCTCACACCTGTAAAAGAAAAAAGAATCAAATTGAATATATCTTTTAAGAATTCAA
AACTAGTGTATTCACTTACCCTAGTTCATTATAAAAAATATCTAGGCATTGTGGATATAAAACT
GTTGGGTATTCTACAACTTCAATGGAAATTATTACAAGCAGATTAATCCCTCTTTTTGTGACAC
AAGTACAATCTAAAAGTTATATTGGAAAACATGGAAATATTAAAATTTTACACTTTTACTAGCT
AAAACATAATCACAAAGCTTTATCGTGTTGTATAAAAAAATTAACAATATAATGGCAATAGGTA
GAGATACAACAAATGAATATAACACTATAACACTTCATATTTTCCAAATCTTAATTTGGATTTA
AGGAAGAAATCAATAAATATAAAATATAAGCACATATTTATTATATATCTAAGGTATACAAATC
TGTCTACATGAAGTTTACAGATTGGTAAATATCACCTGCTCAACATGTAATTATTTAATAAAAC
TTTGGAACATTAAAAAAATAAATTGGAGGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

	Salina	LPS	% de Cambio
IL2	0	0	0,0
IL4	1,06	1,4	32,1
IL6	11	30	172,7
IL8	206	560	171,8
IL10	0,38	0,48	26,3
VEGF	21	46	119,0
IFNg	0,3	0,3	0,0
TNFa	128	327	155,5
IL1a	0,5	0,5	0,0
IL1b	1,46	1,7	16,4
MCP1	79	91	15,2
EGF	4,1	3,4	-17,1

FIGURA 8A

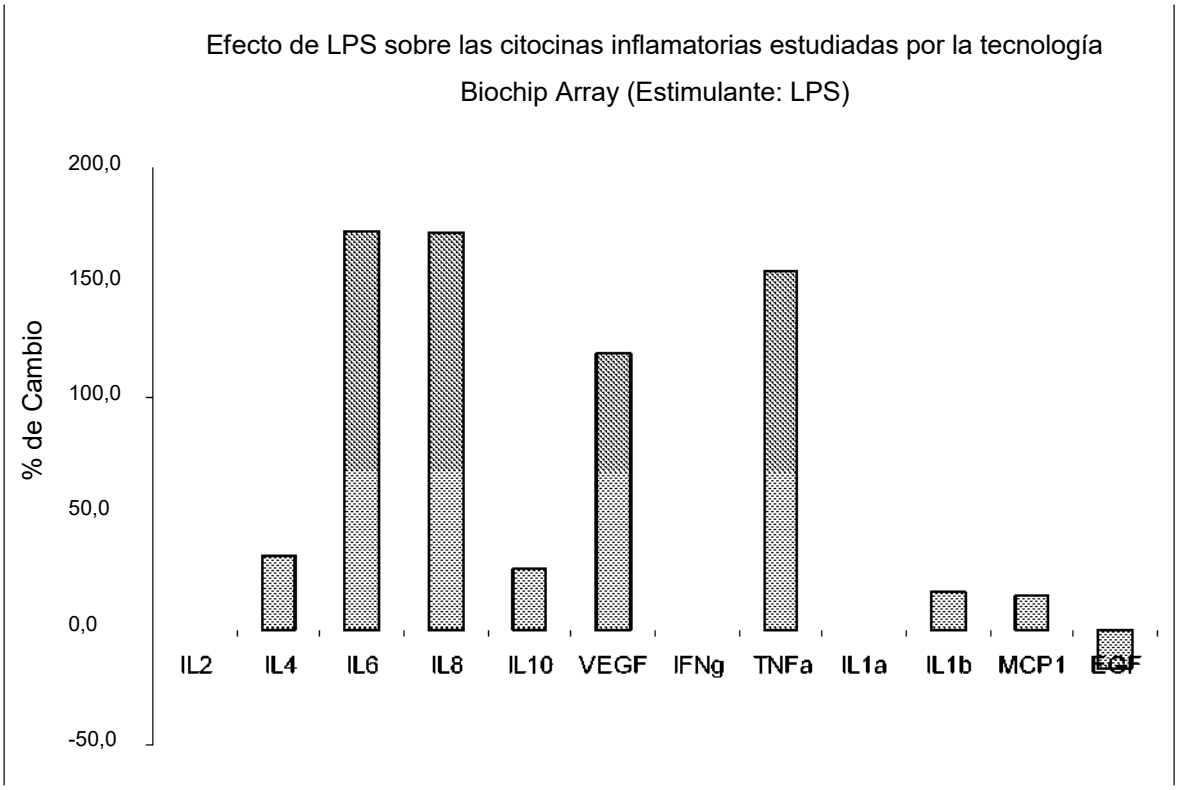

Efecto de LPS sobre las citocinas inflamatorias estudiadas por la tecnología Biochip Array (Estimulante: LPS)
% de Cambio
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
-50,0
IL2
IL4
IL6
IL8
IL10
VEGF
IFNg
TNFa
IL1a
IL1b
MCP1
EGF

FIGURA 8B

	Salina	Lubricina	% de Cambio
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	0,95	-45,2
IFNg	0,22	0,29	31,8
TNFa	9,5	9	-5,3
IL1a	0,25	0,25	0,0
IL1b	7,53	6,92	-8,1
MCP1	223	201	-9,9
EGF	1,75	1,23	-29,7

FIGURA 9A

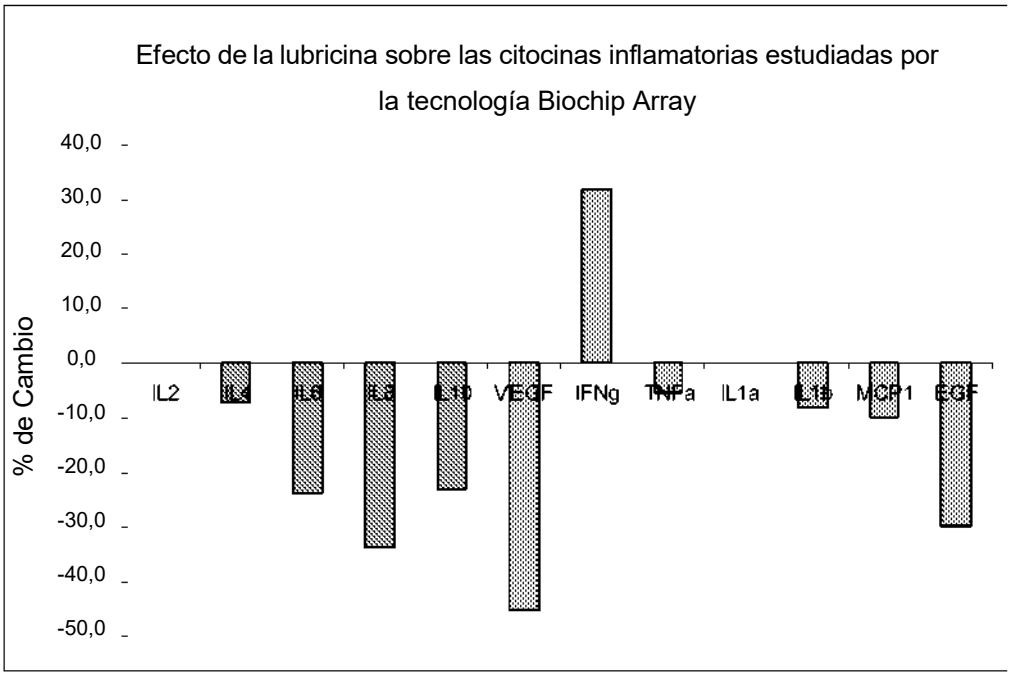

Efecto de la lubricina sobre las citocinas inflamatorias estudiadas por la tecnología Biochip Array
% de Cambio
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
-40,0
-50,0
IL2
IL4
IL6
IL8
IL10
VEGF
IFNg
TNFa
IL1a
IL1b
MCP1
EGF

FIGURA 9B

	LPS	LPS/Lubricina	% de Cambio
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	0,62	0,62	0,0
IL1b	1,62	1,21	-25,3
MCP1	91	68	-25,3
EGF	4,1	2	-51,2

FIGURA 10A

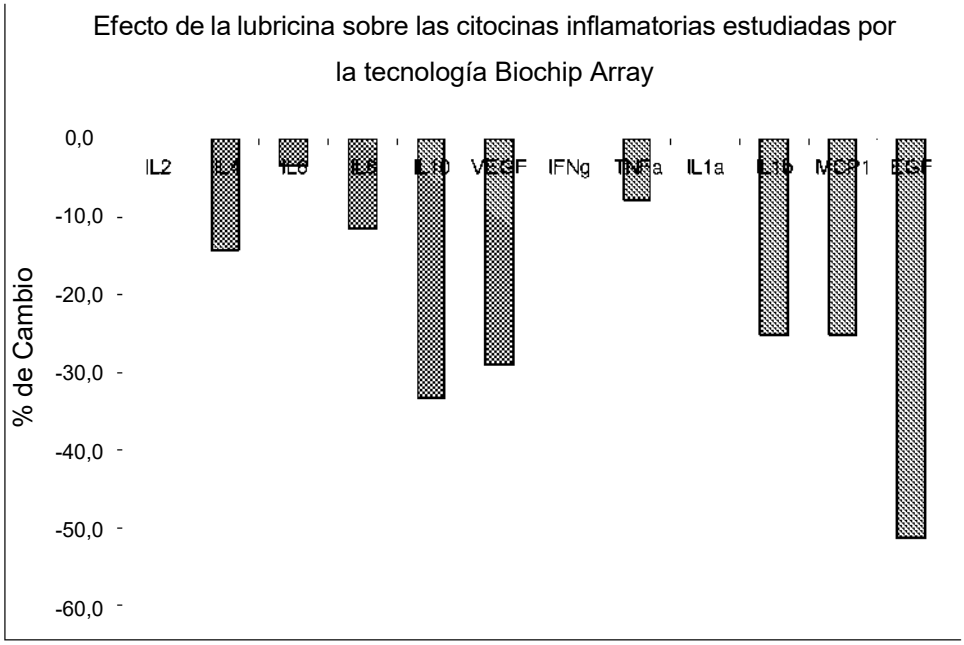

Efecto de la lubricina sobre las citocinas inflamatorias estudiadas por la tecnología Biochip Array
% de Cambio
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
-40,0
-50,0
-60,0
IL2
IL4
IL6
IL8
IL10
VEGF
IFNg
TNFa
IL1a
IL1b
MCP1
EGF

FIGURA 10B

	TNFa	TNFa/Lubricina	% de Cambio
IL2	0	0	0,0
IL4	0,96	0,98	2,1
IL6	95	88	-26,4
IL8	400	235	-41,3
IL10	10	9	-10,0
VEGF	65	41	-36,9
IFNg	1,4	0	-100,0
TNFa	883	34	-96,1
IL1a	0,33	0,41	24,2
IL1b	34	18	-47,1
MCP1	250	250	0,0
EGF	19	11	-42,1

FIGURA 11A

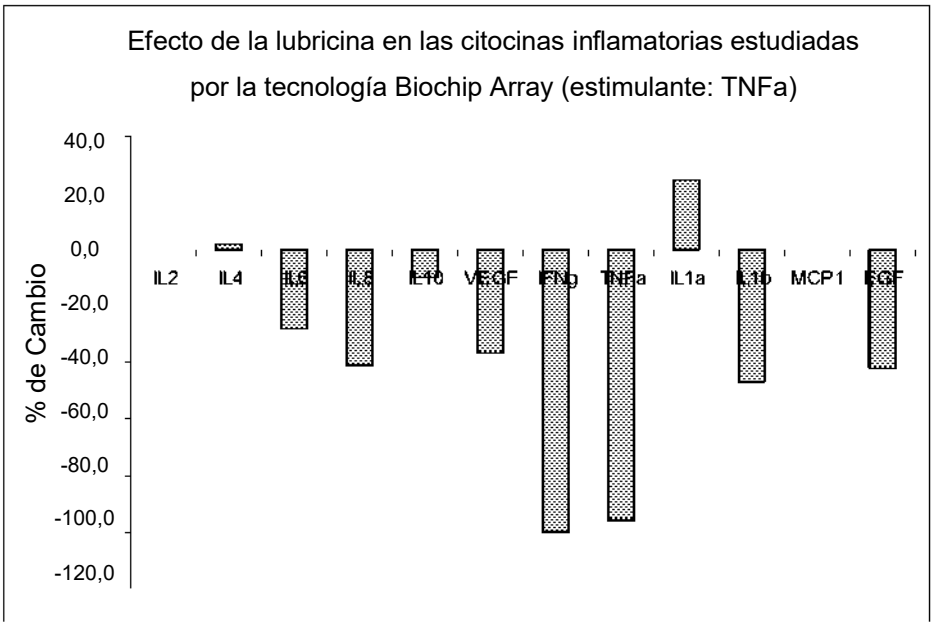

Efecto de la lubricina en las citocinas inflamatorias estudiadas
por la tecnología Biochip Array (estimulante: TNFa)
% de Cambio
40,0
20,0
0,0
-20,0
-40,0
-60,0
-80,0
-100,0
-120,0
IL2
IL4
IL6
IL8
IL10
VEGF
IFNg
TNFa
IL1a
IL1b
MCP1
EGF

Figura 11B

	TF	TF/Lubricina	% de Cambio
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	-303
IL1b	7,16	7,15	-0,4
MCP1	199	166	-15,6
EGF	2,74	1,99	-27,4

FIGURA 12A

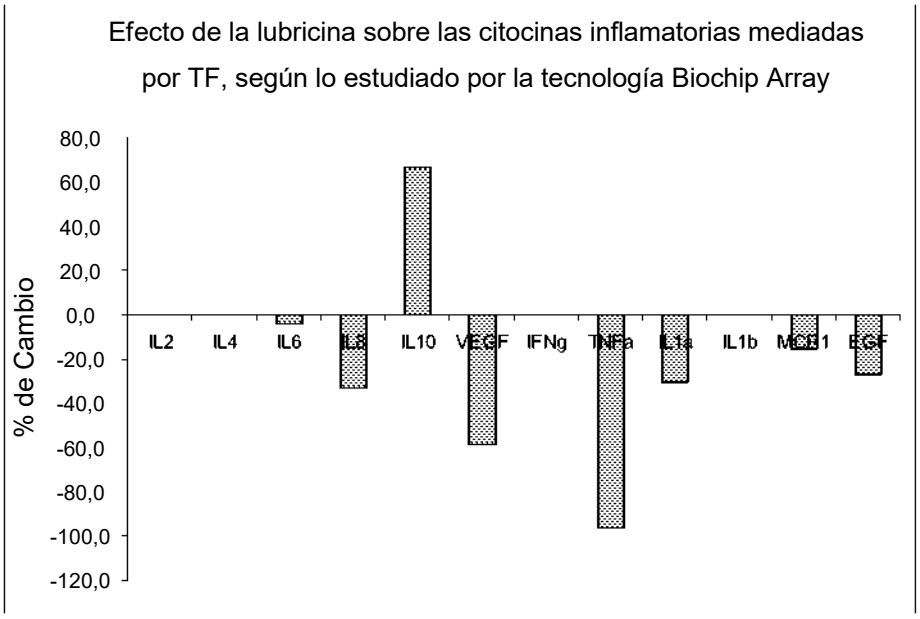
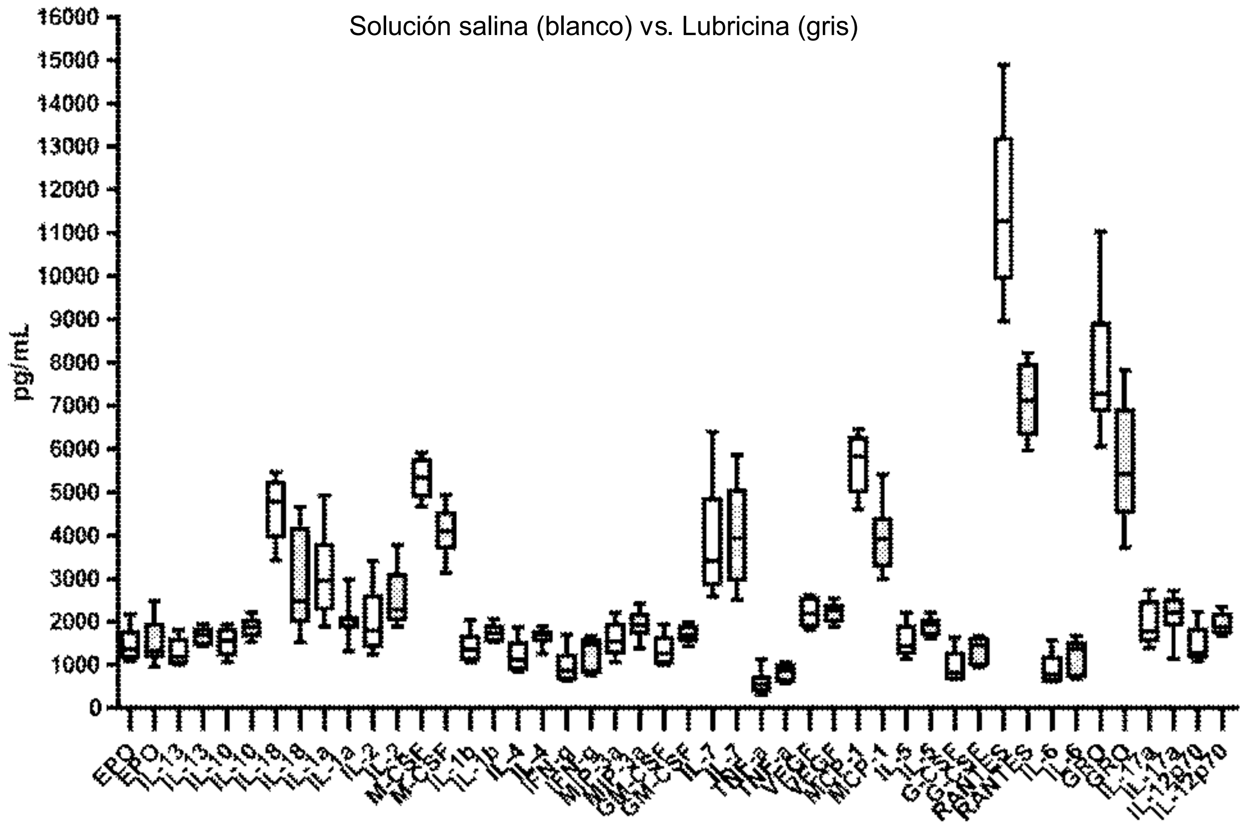

Efecto de la lubricina sobre las citocinas inflamatorias mediadas por TF, según lo estudiado por la tecnología Biochip Array
% de Cambio
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
-40,0
-60,0
-80,0
-100,0
-120,0
IL2
IL4
IL6
IL8
IL10
VEGF
IFNg
TNFa
IL1a
IL1b
MCP1
EGF

FIGURA 12B


Solución salina (blanco) vs. Lubricina (gris)
pg/mL
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
EPO
EPO
IL-13
IL-13
IL-10
IL-10
IL-18
IL-18
IL-1a
IL-1a
IL-2
IL-2
M-CSF
M-CSF
IL-1b
IL-1b
IL-4
IL-4
IFN-g
IFN-g
MIP-3a
MIP-3a
GM-CSF
GM-CSF
IL-7
IL-7
TNF-a
TNF-a
VEGF
VEGF
MCP-1
MCP-1
IL-5
IL-5
G-CSF
G-CSF
RANTES
RANTES
IL-6
IL-6
GRO
GRO
IL-17a
IL-17a
IL-12p70
IL-12p70
FIGURA 13

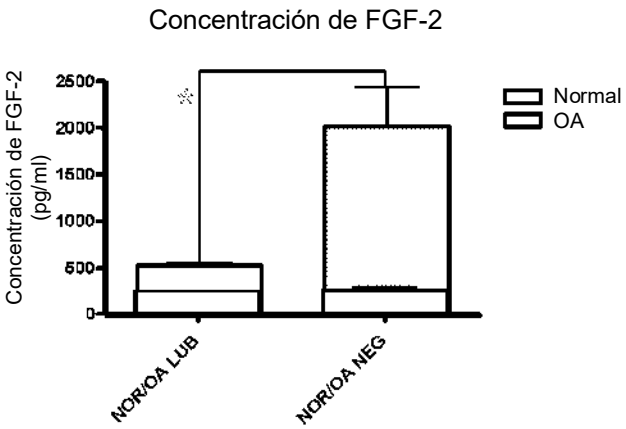


FIGURA 14A

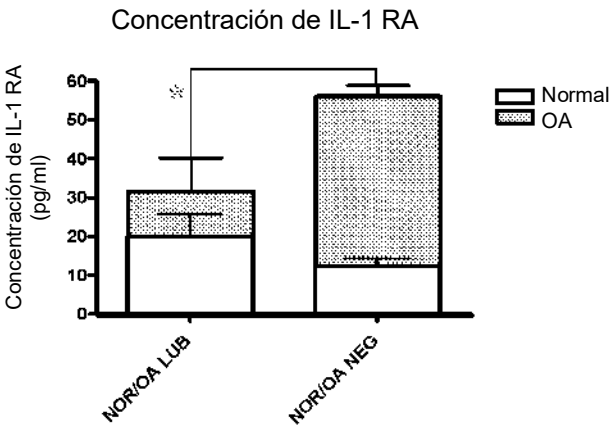


FIGURA 14B

FIGURA 15

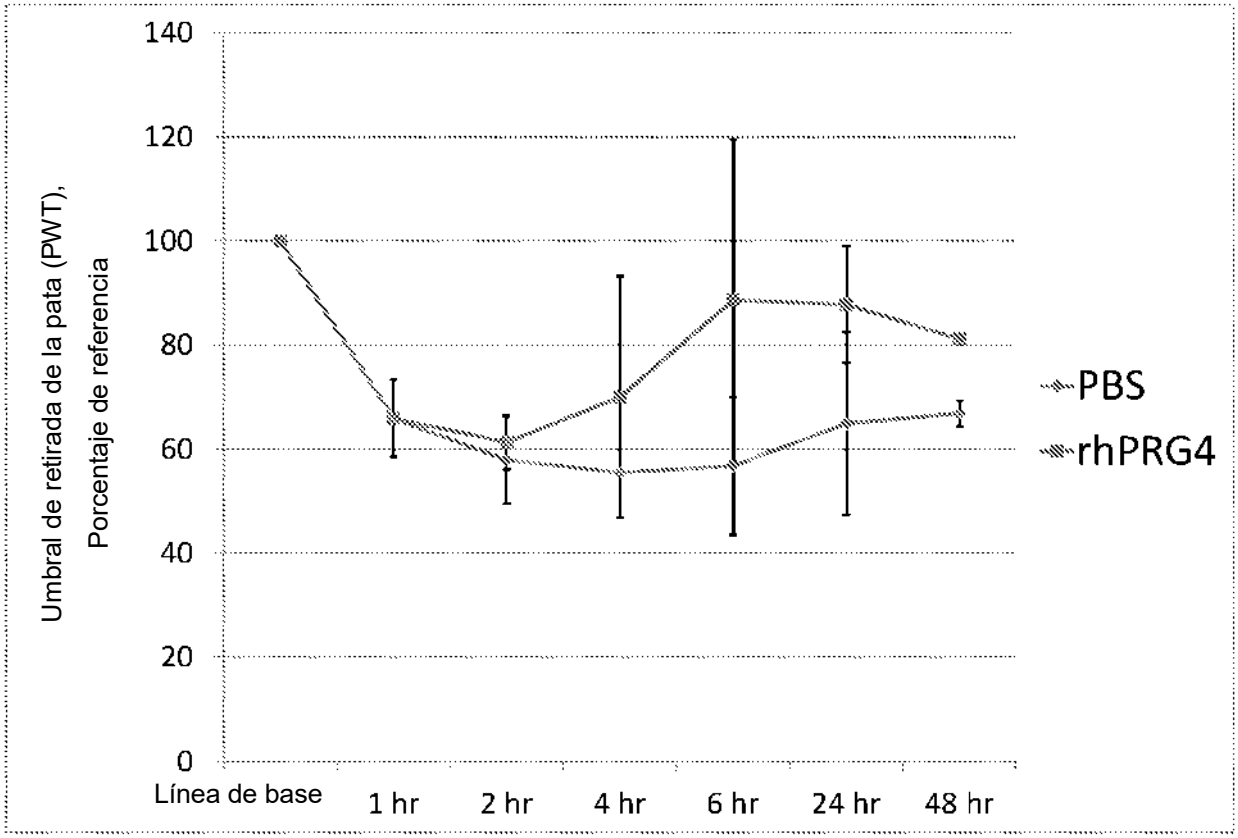


Figura 15 Impacto de la administración intrarticular del proteoglicano humano recombinante 4 (rhPRG4) sobre el cambio inducido por cristales de urato monosódico (MSU) en la presión de retirada de la pata (PWT) en ratas Lewis macho. Se inyectaron ratas Lewis macho (10 semanas de edad; n = 4) con suspensión de MSU (50µl; 5 mg/ml; Invivogen, California) en sus articulaciones de rodilla. Una hora después de la inyección de MSU, las articulaciones de rodilla de las ratas se trataron con 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS; n = 2) o rhPRG4 (50µl; 2 mg/ml) (n=2). Las presiones de retirada de la pata se midieron mediante el uso de un instrumento electrónico Von Frey, y los datos se presentan como un cambio porcentual con respecto a los valores de referencia.