



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0086126  
(43) 공개일자 2013년07월31일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <b>A61K 38/17</b> (2006.01) <b>A61K 38/16</b> (2006.01)<br/> <b>A61P 19/02</b> (2006.01)<br/> (21) 출원번호 <b>10-2012-7028301</b><br/> (22) 출원일자(국제) <b>2011년04월28일</b><br/> 심사청구일자 <b>없음</b><br/> (85) 번역문제출일자 <b>2012년10월29일</b><br/> (86) 국제출원번호 <b>PCT/US2011/034282</b><br/> (87) 국제공개번호 <b>WO 2011/139820</b><br/> 국제공개일자 <b>2011년11월10일</b><br/> (30) 우선권주장<br/> 61/329,078 2010년04월28일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>온콜론, 인코포레이티드</b><br/> 미국, 미시간 48103, 앤 아버, 스위트 1000, 파크<br/> 랜드 프라자 333<br/> (72) 발명자<br/> <b>정, 신청</b><br/> 미국, 미시간 48103, 앤 아버, 메도우리뷰 코트<br/> 2411<br/> <b>우, 웨이</b><br/> 미국, 미시간 48103, 앤 아버, 아파트 104, 폴린<br/> 불마르 2106<br/> (뒷면에 계속)<br/> (74) 대리인<br/> <b>신관호</b></p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **류마티스성 관절염 치료를 위한 가용성 CD24의 용도 및 치료방법**

(57) 요약

본 발명은 CD24 단백질을 이용하여 류마티스성 관절염을 치료하는 치료제로서의 용도 및 치료방법에 관한 것이다. CD24 단백질은 성인 또는 성숙 마우스 CD24, 및 포유류의 면역글로블린의 N- 또는 C-터미널에 결합된 단백질을 포함한다.

대표도 - 도1

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNGLAP**  
**NPTNATTK**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP  
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKKTIPPVLDL  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(72) 발명자

리우, 양

미국, 미시간 48105, 앤 아버, 레드 폭스 런 4970

정, 판

미국, 미시간 48105, 앤 아버, 레드 폭스 런 4970

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

포유동물에 CD24 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 CD24 단백질은 성숙한 마우스 또는 성인 CD24 또는 그의 변이체의 염기서열을 포함하는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 성인 CD24는, SEQ ID NO:1 및 2로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 염기서열로 구성되거나, 또는 상기 성숙한 마우스 CD24는 SEQ ID NO:3의 염기서열로 구성되는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 CD24 단백질은 마우스 또는 인간의 CD24의 세포외 영역을 포함하며, 이 영역은 상기 성숙한 CD24의 N-터미널(terminal) 단부에 결합되어 있는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 세포외 영역은 SEQ ID NO:4의 염기서열로 구성되는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 CD24 단백질은 가용성인 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 CD24 단백질은 글리코실레이트 되어 있는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 8

제 2항에 있어서, 상기 CD24 단백질은, 또한 포유류의 면역글로블린(Ig)의 부분을 더 포함하며, 상기 Ig는 상기 성숙 마우스 또는 성인 CD24의 N-터미너스(terminus) 또는 C-터미너스에 결합되어 있는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 Ig 부분은 인간의 Ig 단백질의 Fc 부분인 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 Fc 부분은 인간의 Ig 단백질의 힌지 영역과 CH2 및 CH3 영역으로 구성되며, 상기 Ig는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgA로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 Fc 부분은 IgM의 힌지 영역과 CH2 및 CH3 영역으로 구성되는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 CD24 단백질은, 진핵세포 단백질 발현 시스템을 이용하여 생성되는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 발현 시스템은, 중국산 햄스터 난소 세포내에 포함된 벡터 또는 복제-결함(replication-defective) 레트로바이러스 벡터를 포함하는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

#### 청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 복제-결함 레트로바이러스 벡터는 진핵세포의 게놈내에 안정적으로 통합되어 있는 류마티스성 관절염을 치료하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 2010년 4월 28일 출원된 미국 임시 특허 출원 제 61/329,078호를 우선권으로 하고 있으며, 그 전체 내용은 참조로서 포함되어 있다.

#### 배경기술

[0002] 본 발명은 류마티스성 관절염 치료를 위한 용도, 조성물과 치료방법에 관한 것이다.

#### 발명의 내용

##### 해결하려는 과제

[0003] 다음의 설명은 반드시 필요하지는 않은 종래의 기술의 배경 정보와 전체 범위 또는 모든 특징들을 광범위하게 기재하고 있지 않은 본 발명의 일반적인 요약을 제공하고 있다.

[0004] CD24는 열-안정 항원으로 알려져 있다(1). 그것은 글리코실-포스파티딜-이노시톨(GPI)-앵커 분자(glycosyl-phosphatidyl-inositol(GPI)-anchored molecule)로 발현되며(2), 서로 다른 계통들에서 광범위하게 분포되어 있다(3). 미성숙 세포들에서 발현되는 CD24의 특성으로 인해, 줄기세포 마커의 일부분으로서, 그리고 림프구 분화(differentiation)용으로 사용되어왔다. CD24와 관련된 첫 번째 기능은 항원-특이성 T 세포 반응을 위한 코스티뮬레이토리 활성(costimulatory activity)이다(4-6). 생체내 연구들은 림프구 기관내에서 T 세포 활성을 위한 코스티뮬레이터(costimulator)로서, CD24가 CD28이 없는 상태에서는 필수적이라는 사실을 보여주고 있다(7, 8). 이것은 "코스티뮬레이터가 풍부하지(costimulator rich)" 않은 국소 타겟 기관에 대한 것은 아니다. 이러한 개념에 따라, 우리는 CD24의 타겟된 변이(trageted mutation)를 가지는 마우스가 실험적인 자동면역(autoimmune) 뇌척수염(EAE)의 발병에 대해 완전히 저항한다는 것을 밝혀냈다(9, 10).

[0005] 인간 CD24의 다형태성(polymorphism)은 다발성 경화증 및 류마티스성 관절염(RA)을 포함하는, 몇 가지 자동면역 질병들(11-15)의 위험과 진행과 관련이 있다. 다발성 경화증의 경우에, 우리는, 뮤린(murine) CD24의 세포의 부분과 인간 IgG1 Fc로 구성되는 가용성 CD24가, 다발성 경화증의 마우스 모델, 즉 실험적 자동면역 질병들의 임상적인 증상들을 개선시켰다는 것을 보고한 바 있다(9). 더욱 최근의 연구에 의해 우리는, CD24가 위험-관련 분자 패턴들(DAMPs)에 대한 숙주 응답과 상호 작용하며, 그 응답을 억압한다는 것을 보고한 바 있다(16).

[0006] RA는 인구의 0.5-1%에 영향을 미치고 있다. 수 많은 질병-변형 항류마티스성 약물(disease-modifying antirheumatic drugs : DMARDs)들이 현재 사용되고 있으나, 생물학적 DMARDs의 주요 기준, 즉 종양-괴사 인자 알파를 대상으로 하는 치료제들은, 치료를 받는 환자들의 50% 이하에서, 류머티스학 개선 기준의 미국 대학(ACR50)에 따르면 50% 개선을 이끌어 내었다(17). RA는 치료되지 않는다. 그러므로, RA에 대한 추가적인 치료제를 시험하는 것이 필요하다. 질병들의 원인들은 대부분 확실하지 않지만, RA는 관절내의 자동면역 질병으로 추측되고 있다. 수 많은 연구들은 류마티스성 관절염의 원인에는 T 세포가 관련되어 있다는 것을 암시하고 있다(18). 더욱 최근에는, 항체들의 이동이 마우스의 관절 염증을 유발시킬 수 있다는 것이 입증되었다(19-21). 외상(lesion)의 병리학은 인간의 류마티스성 관절염과 유사하다.

[0007] 항체에 의한 RA의 수동적인 전달과 관련된 연구에 따르면, 가장 흥미로운 개념들중의 하나는, 항체들이 일반적으로 널리 발현될 수 있는 단백질에 대해 특정되어 있더라도, 조직-특이 자동면역 질병들은 관찰될 수 있다는 사실이다(19-21). 이러한 개념은 중요하며, 그 이유는, 공유된 질병 발생 이론에도 불구하고, 다른 기관/조직들에 대한 자동면역 질병들이 다른 치료를 요구한다는 사실을 제시하고 있기 때문이다. 이러한 개념의 지지하에, 다발성 경화증 치료를 위해 널리 이용되는, 인터페론  $\beta$ 는 RA 치료에는 거의 효과를 나타내지 않는다

(22).

- [0008] 인간 RA에 대한 동물 모델들은 DMARDs의 치료제 개발에 중요한 역할을 하였다. 예를 들면, 마우스와 랫트(rat)에 콜라겐-유도에 의해 발생하는 관절염은 RA의 치료제의 개발을 위해 중요하였다(23). 더욱 최근에는, 항-콜라겐 항체들의 적응적 전달이 마우스내에서 강한 RA-유사성 외상을 발생시킨다는 것이 밝혀졌다(19). 질병의 발현 이전에 자동-항체들은 RA 환자들내에서 많아지므로(24, 25), 콜라겐-특이 항체의 수동적인 전달은 인간 RA에 대한 관련 모델이 된다.
- [0009] RA의 질병 발생론은 DAMP에 대한 숙주 응답(26, 27)을 포함하고, CD24 분자는 DAMPs에 대한 숙주 응답을 부정적으로 규제하므로(16), 우리는 RA를 치료하기 위해서 가용성 CD24를 이용할 수 있는 가의 가능성을 조사하였다. RA의 수동적인 전달 모델이 선택된 이유는, 인간의 질병들과 관련성이 있으며 실험 계획의 단순성 때문이었다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 CD24 단백질을 그것이 필요한 포유 동물에게 투여하여 류마티스성 관절염을 치료하는 용도 및 방법을 제공하는 것이다. CD24 단백질은 성숙한 마우스의 CD24 또는 성인 CD24 또는 그의 변종의 염기서열을 포함할 수 있다. 성인 CD24는, SEQ ID NO:1 또는 2의 염기서열로 구성될 수 있다. 성숙한 마우스 CD24는 SEQ ID NO:3의 염기서열로 구성될 수 있다. CD24 단백질은 마우스 또는 인간의 CD24의 세포외 영역을 포함하며, 이 영역은 성숙한 CD24의 N-터미널(terminal) 단부에 결합되어 있다. 세포외 영역(extracellular domain)은 SEQ ID NO:4의 염기서열로 구성될 수 있다. CD24 단백질은 또한 포유류의 면역글로블린(Ig)의 일부를 포함하며, Ig는 성숙 CD24의 N-터미너스(terminus) 또는 C-터미너스에 결합되어 있다. Ig 부분은 인간의 Ig 단백질의 Fc 부분일 수 있으며, Ig 단백질은, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA일 수 있다. Fc 부분은 인간의 Ig 단백질의 힌지 영역과 CH3 및 CH4 영역을 구성할 수 있다.
- [0011] CD24 단백질은 가용성이며, 글리코실레이트화되어 있다(glycosylated). CD24 단백질은, 진핵세포 단백질 발현 시스템을 사용하여 생성될 수 있다. 발현 시스템은, 중국산 햄스터 난소 세포내에 포함된 벡터 또는 복제-결함(replication-defective) 레트로바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 복제-결함 레트로바이러스 벡터는 진핵세포의 게놈내에 안정적으로 통합될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0012] 여기에 기술된 데이터는 CAIA에 대한 CD24Fc의 높은 치료 효능을 보여준다. 안전에 대한 우리의 광범위한 데이터를 감안할 때, 안정성과 우리의 CD24Fc 성공적인 제조는 모두 RA에 대한 치료로서 융합 단백질(fusion protein)의 많은 잠재력을 암시한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은, CD24 융합 단백질의 아미노산 조성물, CD24IgG1Fc(SEQ ID NO: 5)를 도시하고 있다. 밑줄친 부분 26 아미노산은 CD24(SEQ ID NO: 4)의 단일 펩타이드이다. 염기서열의 상자내의, 굵은 부분은 융합 단백질(SEQ ID NO: 1)에서 사용되는 성숙 CD24 단백질이다. 성숙 CD24 단백질내에 일반적으로 존재하는 마지막 아미노산(A 또는 V)은 면역원성(immunogenicity)을 피하기 위하여, 구성으로부터 삭제되었다. 밑줄이 표시되지 않고, 굵은 선으로 표시되지 않는 글자들은 CH1과 CH2 영역들(SEQ ID NO: 6)과 힌지 영역(hinge region)을 포함하는 IgG1 fc의 서열들이다.

도 2는, 포유류 세포 라인들로부터 발현되는 CD24IgG1Fc의 정제와 처리를 위한 방법을 도시한 도면이다.

도 3은, 마우스(SEQ ID NO: 3)와 인간(SEQ ID NO: 2)으로부터 성숙 CD24 단백질들 간의 아미노산 염기서열 변이체들을 도시한 도면이다. 강력한 글리코실레이션(glycosylation) 사이트는 굵은 글자로 표시되어 있으며, N-글리코실레이션 사이트는 빨간색으로 표시되어 있다.

도 4는, RA에 대한 CD24Ig의 치료 효과를 도시한 도면이다. 8-10주령(weeks)의 항체 칵테일(cocktail)(MDbioproducts, St Paul, MN)을 유도하는 ArthritoMab 관절염의 수컷 BALB/c 마우스들에게 한 마리당 20mg의 투여량으로 정맥을 통해 주사하여 면역시켰다. 2일 후에, 그 마우스들에게 PBS에 용해된 90 µg의 LPS가 I.p. 투여되었다. 질병의 진행은 다음의 수치 시스템에 따라 매일 검사되었다. 0. 반응 없음, 정상; 1, 약간 영향을 받는 수족들과는 관계없이 각각의 손에 한정되는 손상된 손목/발목의 한정된 발적과 부종 또는 외관적 발적(apparent redness)과 부종(swelling); 2, 손목/발목의 심각한 발적과 부종에 대해 보통(Moderate);

3, 전체 발(paw)의 발적과 부종; 4, 다수의 관절들을 포함하고, 염증이 가장 심한 수족. 도시된 데이터는 4개의 수족(평균±SE)으로부터 얻어지는 복합 수치들이다. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . 두 개의 그룹들간의 차이도 역시 Fisher PLSD 시험에서 중요하다.

도 5는, CD24IgG1의 약물동력학의 윈놀린 부분(WinNonlin compartmental) 모델링 분석을 도시한 도면이다. 개 열된 윈은 마우스 3마리의 평균을 나타내며, 라인은 예측되는 약물동력학 곡선 즉, a. 1mg CD24IgG1의 I.v. 투여, b. 1mg CD24IgG1의 s.c. 투여 곡선이다. c는 곡선 하부에 의해 측정되는(AUC) 혈액내의 항체의 총 양, 반감기 및 최대 혈액 농도를 나타내고 있다. 차이는 통계학적으로는 중요하지 않지만, AUC와 s.c. 투여의  $C_{max}$ 는 i.v. 투여의 약 80%이다.

도 6은, CD24-Siglec G(10) 상호 작용이 PAMP와 DAMP 간의 차이를 판별하는 단계를 도시한 도면이다. A. PAMP에 대한 숙주 반응은 CD24-Siglec G(10) 상호 작용에 의해 영향을 받지 않았다. B. CD24-Siglec G(10) 상호 작용은 Siglec G/10-관련 SHP-1을 통해 DAMP에 대한 숙주 반응을 억제한다.

도 7은, CD24Fc의 일회 주사 투여가 CAIA의 임상학적인 수치의 감소를 나타내는 도면이다. a. 실험의 도면들. BALB/c 마우스들이(8주), 담체 또는 퓨전 단백질과 함께 첫 날에 mAbs를 투여 받았다. 그 마우스들은 3일째에 LPS를 투여 받았으며, 3주 동안 매일 관찰되었다. b. CD24Fc는 CAIA의 임상학적인 수치들을 감소시켰다. 퓨전 단백질(1mg/mouse) 또는 담체는 첫 날에 한 번 투여 되었다. 임상학적인 수치들은 이중 맹검법(double-blind)에 의해 결정되었다. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ . CD24의 효과는, PBS 그룹내의 52마리 마우스와 CD24Fc 그룹내의 54마리 마우스를 모두 포함하는, 6개의 독립적인 실험군들에서 재현되었다.

도 8은, CD24Fc는 관절과 CAIA내의 염증성 시토킨들의 레벨들을 감소시키 것을 나타내는 도면이다. 도 7a에 도시된 바와 같이, CAIA로 시작되었고 치료되었다. 염증성 시토킨들은 BD 파르민겐(pharminogen)으로부터 시토킨 비드 배열(bead array)에 의해 측정되었다. a. 대표적인 FACS 프로파일, b. 관절 호모지네이트들(homogenates)내에서 측정된 감소된 시토킨(Mean±SE)의 요약.

도 9는, CD24Fc가 관절내의 연골의 염증화와 파괴를 감소시키는 것을 나타내는 도면이다. 7일차에, CD24Fc로 치료된 마우스와 대조 마우스의 앞발과 뒷발이 각각 해부되었다. 24시간 동안 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정되었으며, 그 후에 5% 포름산(formic acid)으로 탈석회(decalcification) 작업이 진행되었다. 발들은 파라핀에 보관하였으며, 세로 부분은 H&E와 Safranin O 적색 (Sigma-Aldrich)으로 착색되었다.

도 10은, CAIA 발병(induction) 5일차에 투여된 D24Fc의 치료 효과를 나타내는 도면이다. CAIA에 의해 발병된 마우스들은 두 그룹으로 임의적으로 나누고, 담체(PBS) 또는 CD24Fc를 투여받았다. 마우스들은 이중 맹검법에 의해 수치화되었다. 3개의 독립적인 실험들중 대표적인 수치들이 도시되어 있다.

도 11은, CD24Fc의 낮은 투여량이 CAIA의 발현을 예방하는 것을 나타내는 도면이다. a. 실험 도면들, b. 관절염의 임상적 수치들. 이 수치들은 이중 맹검법에 의해 결정되었다.

도 12는, SiglecG가 CD24Fc의 치료적 효과에 필수적이라는 것을 나타내는 도면이다. WT의 (a)와 SiglecG<sup>-/-</sup> 마우스 (b)는 항-콜라겐 mAbs의 카테일과 함께 담체 대조(vehicle control) 또는 CD24Fc를 투여 받았다. 임상학적 수치들은 이중 맹검법에 의해 매일 기록되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명자들은 CD24의 가용성 형태가 류마티스성 관절염을 치료하는데 매우 효과적이라는 사실을 발견하였다.

#### [0015] 1. 정의들

[0016] 여기에서 사용하는 용어들은 단지 특정한 태양들을 기재하기 위한 것이며, 발명을 제한하는 것은 아니다. 명세서와 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 “a” 나, “an” 그리고 “the” 는 문맥상에서 특별하게 다른 것을 지시하지 않는 한 복수의 대상들을 포함한다.

[0017] 여기에 기재된 수치 범위의 설명을 위해서, 각 중간 수치는 동일한 정도의 정확도를 가지고 명백하게 고려되어 졌다. 예를 들면, 6-9의 범위에 대해서는, 7과 8이 6과 9외에도 고려되어지며, 6.0-7.0의 범위에 대해서는, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9와 7.0이 명백하게 고려된다.

[0018] “펩타이드” 또는 “폴리펩타이드”는 아미노산의 서열이 될 수 있으며, 천연적, 합성적 또는 천연, 합성 또는



그 변형 또는 그들의 조합이 될 수 있다.

[0019] “실질적으로 동일하다”라는 말은 제 1과 제 2아미노산 서열들이, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, or 300 아미노산의 영역에서, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 된다는 것을 의미한다.

[0020] 질병으로부터 동물을 보호한다는 표현을 할 때에 사용되는, “치료” 또는 “치료하다”는 질병의 예방, 억제, 억압 또는 완전한 제거를 의미한다. 질병을 예방하는 것은 그 질병의 발병 이전에 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 질병의 억제(suppressing)는 질병의 발병 후에 그러나 임상적 현상이 나타나기 이전에 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 질병의 억압(repressing)은 그 질병의 임상학적인 현상 이후에 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0021] “변이체”는 삽입, 삭제, 또는 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution)에 의해 아미노산 염기서열이 다르나, 최소한 한 개의 생물학적인 활동을 유지하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. “생물학적 활성”의 대표적인 보기들은 톨유사(toll-like) 수용체에 대한 결합 능력 및 특정 항체에 의한 결합을 포함한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 가지는 아미노산 염기서열을 가지는 기준 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 염기서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 아미노산을 유사한 특성들(예를 들면, 친수성(hydrophilicity), 하전된 영역(charged region)의 정도 및 분포 등)을 가지는 서로 다른 아미노산으로 대체하는 것은, 일반적으로 사소한 변화를 포함하는 기술로 인식되고 있다. 이러한 사소한 변화들은 Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132(1982)에 기재된 바와 같이, 아미노산의 수치료법(hydrophobicity) 지수를 고려함으로써 부분적으로 파악될 수 있다. 아미노산의 수치료법 지수는 소수성(hydrophobicity)과 전하에 근거하여 얻어진 것이다. 유사한 수치료법 지수들은 치환될 수 있으며, 단백질 기능을 유지할 수 있다는 것이 기존의 기술에서 이미 알려져 있다. 한 특징에서는, 수치료법 지수  $\pm 2$ 를 가지는 아미노산은 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 유지하는 단백질들을 생성하는 치환들을 나타내기 위해 이용될 수 있다. 펩타이드와 관련지어 살펴보면 아미노산의 친수성에 의해 펩타이드의 가장 큰 부분 평균 친수성을 계산할 수 있다. 이것은 항원성 및 면역성과 상관 관계를 가지고 있다는 것을 나타내는 유용한 측정 자료이다. 미국 특허 4,554,101호는 여기에서 참조로서 그 내용이 포함되어 있다. 기존의 기술에서 이미 알려진 바와 같이, 유사한 친수성을 가지는 아미노산의 치환은 생물학적 활동, 예를 들면, 면역성을 유지하는 펩타이드를 생성시킬 수 있다. 치환들은 각각  $\pm 2$ 의 친수성 값들을 가지는 아미노산에 의해 실행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수와 친수성 값들은 모두 그 아미노산의 특정한 측쇄(side chain)에 의해 영향을 받게 된다. 그러한 관찰에 따라, 생물학적 기능을 실현하는 아미노산 치환들은 아미노산의 상대적인 유사성에 의해 영향을 받으며, 소수성, 친수성, 전하, 크기, 및 다른 특성들에 의해 알려진 바와 같이, 특히 아미노산의 측쇄들에 의해 영향을 받게 된다.

## [0022] 2. CD24

[0023] 본 발명에서는 성숙한 인체 CD24 단백질에 관한 것이며, 이 단백질은 SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK (SEQ ID NO:1) 또는 SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK(V/A) (SEQ ID NO:2)가 되는, 성인의 CD24의 아미노산 염기서열, 또는 NQTSVAPFPGNQNISASPNTNATTRG (SEQ ID NO:3)이 되는, 성숙 마우스의 CD24의 아미노산 염기서열, 또는 그의 변종이 될 수 있다. CD24는 용해성이 될 수 있다. CD24는 또한 아미노산 염기서열, MGRAMVARLGLGLLLALLPTQIYS (SEQ ID NO:4)를 가지는, N-터미널 펩타이드를 포함할 수 있다. CD24는 또한 도 1 또는 도 3에 기재된 아미노산 염기서열을 가질 수 있다. CD24는 두 개의 알렐릭(allelic) 형태중에서 한 개의 형태로 존재한다. 그러므로, 성인의 CD24의 C-터미널 아미노산은 발린 또는 알라닌이 될 수 있다. C-터미널 발린 또는 알라닌은 면역성을 감소시키기 위해 CD24로부터 삭제될 수도 있다. 두 알렐(allels)간의 차이점은 다발성 경화증 및 RA와 같은, 자가면역 질병의 위험성에 영향을 끼칠 수 있다. 그럼에도 불구하고, 두 개의 알렐 형태는 막-결합 형태(membrane-bound form)의 발현 레벨들에 대해 영향을 미치므로, 변형은 CD24의 기능에 대해 영향을 끼치지 않게 된다.

[0024] 인간과 마우스로부터 얻어지는 성숙(mature) CD24 단백질의 아미노산 서열내에 상당한 염기서열 변화가 발생되더라도, 그것들은 위험-관련 분자 패턴(DAMP : danger-associated molecular patterns)과의 상호 작용에 있어

서 기능적으로 동등하게 된다. DAMP에 대한 숙주 반응(host response)은 RA의 질병 발생에 대해 매우 중요하므로, 마우스(mouse)와 인간의 CD24는 RA를 치료하는데 있어서 기능적으로 동등하게 될 수 있다. C-터미너스(terminus)내에 주로 존재하는 마우스와 인간의 CD24 사이의 염기서열 보존의 결과로서 그리고 다수의 글리코실레이션 사이트(glycosylation site)내에서, 성숙 CD24 단백질내의 주요 변화들은 RA를 치료하기 위해서 CD24를 이용하는 경우에 허용될 수 있다. 특히 그 변화들이 C-터미너스내의 보존 잔존물에 대해 영향을 끼치지 않거나 또는 마우스 또는 인간의 CD24로부터 글리코실레이션 사이트에 대해 영향을 끼치지 않는 경우에 허용될 수 있다.

**[0025] a. 결합**

CD24는 N- 또는 C-터미널 단부에서, 마우스 또는 인간이 될 수 있는 포유류의 Ig 단백질의 한 부분에 결합될 수 있다. 그 한 부분은 Ig 단백질의 Fc 영역이 될 수 있다. Fc 영역은 Ig 단백질의 힌지 영역과 CH2 및 CH3 영역들을 포함할 수 있다. Ig 단백질은 인간의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA가 될 수 있다. Fc 영역은 SEQ ID NO:6으로 구성될 수 있다. Ig 단백질은 또한 IgM이 될 수 있으며, Fc 영역은 IgM의 힌지 영역과 CH2 및 CH3 영역들을 포함할 수 있다. CD24는 또한 N- 또는 C-터미너스에서, GST, His 또는 FLSG가 되는 단백질 태그에 결합될 수 있다. 결합(fusion) 단백질을 만들고 순화하는 방법들이 이미 알려져 있다.

**[0027] b. 생산**

CD24는 과도하게 글리코실레이트 될 수 있으며, 위험-관련 분자 패턴과의 코스티뮬레이션(costimulation) 및 상호작용과 같은 CD24의 기능들과 관련된다. CD24는 진핵세포 발현 시스템을 이용하여 만들어진다. 발현 시스템은 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포들과 같은 포유류 세포내의 벡터로부터 얻어지는 발현을 수반한다. 그 시스템은 진핵 세포들을 감염시키는데 이용되는 복제-결점 레트로바이러스 벡터와 같은 바이어스 벡터가 될 수 있다. CD24는 또한 벡터 또는 분자 계놈내에 통합되어진 벡터의 한 부분으로부터 CD24를 발현하는 안정된 세포 라인으로부터 생성될 수 있다. 안정된 세포 라인에 통합된 복제-결점 레트로바이러스 벡터로부터 CD24를 발현할 수 있다. 그 발현 시스템은 GPE<sub>x</sub><sup>TM</sup>이 될 수 있다.

**[0029] 3. 치료 방법**

CD24는 류마티스성 관절염을 치료하기 위해 이용될 수 있다. CD24는 그것을 필요한 환자에게 투여될 수 있다. 환자는 인간과 같은 포유류가 될 수 있다.

**[0031] a. 복합된 CD24 치료법**

CD24는 질병-변형 항류마티스성 약물(disease-modifying antirheumatic drug : DMARD)과 같은 다른 약품과 병용투여할 수 있다. 그 다른 약품은 비스테로이드성 소염제(anti-inflammatory drug : NSAID)가 될 수 있다. 이들은 프로피온산 유도체, 아세트산 유도체, 에놀산 유도체, 페나민산 유도체, 또는 선택적 Cox2 억제제가 된다. 그 약품은 또한 코르티코스테로이드 또는 메토폅렉세이트(Methotrexate)가 될 수 있다. 그 약품은, 항 TNF- $\alpha$  항체 또는 TNF- $\alpha$  (Enbrel)에 결합하는 융합 단백질과 같은 TNF- $\alpha$  길항제, 항 CD20 mAb, 모노클로날 항체와 같은 자극 분자 CD80과 CD86의 길항제, 또는 상기 두 개의 분자에 결합하는 융합 단백질(CTLA4Ig), 또는 IL-1, 또는 IL-6의 수용체에 대한 길항제가 될 수 있다. 그리고, 다른 약품은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

**[0033] b. 약학적 조성물**

CD24는 연장된 기간 동안에 CD24를 안정적으로 유지할 수 있는, 용매를 포함하는 약학적 조성물내에 포함될 수 있다. 그 용매는 PBS가 될 수 있으며, -20℃(-15℃ ~ -25℃)에서 최소한 36개월 동안 CD24를 유지할 수 있다. 그 용매는 다른 약품과 함께 CD24를 수용할 수 있다.

**[0035] c. 투여량**

인간을 위해 이용되는 투여량은 허용가능 독성 및 임상 효과를 가지는 투여를 결정하기 위해서 임상 실험을 통해 최종적으로 결정된다. 인간을 위한 초기의 임상 투여는 설치류 및 인간이 아닌 영장류에 대한 독성 및 약물 동력학 실험을 통해 추정될 수 있다. CD24의 투여는 투여의 경로 및 치료되는 질병의 정도에 따라, 0.01 mg/kg - 1000mg/kg가 될 수 있으며, 1-50 mg/kg가 될 수도 있다.



[0037] d. 투여

[0038] 약학적 조성물의 투여 경로는 비경구가 될 수 있다. 비경구(parenteral) 투여는 질병 부분에 대해 정맥내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여, 피하투여, 근육내 투여, 수막공간내 투여, 관절 내 투여 그리고 직접 투여를 포함하나, 이들에 한정되지는 않는다. 수의과용으로는, 약물을 정상적인 수의과 법에 따라 적합하게 허용가능한 조성물로서 투여될 수 있다. 수의사는 용이하게 투여 방법 및 특정한 동물에게 가장 적합한 투여 경로를 결정할 수 있다. 약학적 조성물은 인간 환자, 고양이, 개, 대형 동물 또는 조류에 대해 투여될 수 있다.

[0039] CD24는 다른 치료와 함께 동시에 또는 간격을 두어 투여될 수 있다. 여기에서 사용되는 용어 “동시” 또는 “동시에”는 CD24와 다른 치료법이 48시간, 바람직하게는 24시간, 더욱 바람직하게는 12시간, 더욱 더 바람직하게는 6시간, 가장 바람직하게는 3시간 이내에 각각 투여된다는 것을 의미한다. 여기에서 사용되는 용어 “규칙적으로”는 투여를 반복적으로 하기 위해서 어느 빈도수에 따라, 다른 치료법과는 다른 시간대에서 그 약물의 투여가 이루어지는 것을 의미한다.

[0040] CD24는, 다른 치료 이전에 어느 시점에서 투여될 수 있다. 어느 시점은, 약 120 시간, 118 시간, 116 시간, 114 시간, 112 시간, 110 시간, 108 시간, 106 시간, 104 시간, 102 시간, 100 시간, 98 시간, 96 시간, 94 시간, 92 시간, 90 시간, 88 시간, 86 시간, 84 시간, 82 시간, 80 시간, 78 시간, 76 시간, 74 시간, 72 시간, 70 시간, 68 시간, 66 시간, 64 시간, 62 시간, 60 시간, 58 시간, 56 시간, 54 시간, 52 시간, 50시간, 48 시간, 46 시간, 44 시간, 42 시간, 40 시간, 38 시간, 36 시간, 34 시간, 32 시간, 30 시간, 28 시간, 26 시간, 24 시간, 22 시간, 20 시간, 18 시간, 16 시간, 14 시간, 12 시간, 10 시간, 8 시간, 6 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간, 1 시간, 55 분, 50 분, 45 분, 40 분, 35 분, 30 분, 25 분, 20 분, 15 분, 10 분, 9 분, 8 분, 7 분, 6 분, 5 분, 4 분, 3 분, 2 분 및 1 분을 포함한다. CD24는 CD24의 2차 치료 이전에 어느 시점에서 투여될 수 있다. 어느 시점은, 약 120 시간, 118 시간, 116 시간, 114 시간, 112 시간, 110 시간, 108 시간, 106 시간, 104 시간, 102 시간, 100 시간, 98 시간, 96 시간, 94 시간, 92 시간, 90 시간, 88 시간, 86 시간, 84 시간, 82 시간, 80 시간, 78 시간, 76 시간, 74 시간, 72 시간, 70 시간, 68 시간, 66 시간, 64 시간, 62 시간, 60 시간, 58 시간, 56 시간, 54 시간, 52 시간, 50시간, 48 시간, 46 시간, 44 시간, 42 시간, 40 시간, 38 시간, 36 시간, 34 시간, 32 시간, 30 시간, 28 시간, 26 시간, 24 시간, 22 시간, 20 시간, 18 시간, 16 시간, 14 시간, 12 시간, 10 시간, 8 시간, 6 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간, 1 시간, 55 분, 50 분, 45 분, 40 분, 35 분, 30 분, 25 분, 20 분, 15 분, 10 분, 9 분, 8 분, 7 분, 6 분, 5 분, 4 분, 3 분, 2 분, 및 1 분을 포함한다.

[0041] CD24는 다른 치료 이후의 어느 시점에서 투여될 수 있다. 어느 시점은, 약 1분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 7 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 35 분, 40 분, 45 분, 50 분, 55 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간, 12 시간, 14 시간, 16 시간, 18 시간, 20 시간, 22 시간, 24 시간, 26 시간, 28 시간, 30 시간, 32 시간, 34 시간, 36 시간, 38 시간, 40 시간, 42 시간, 44 시간, 46 시간, 48 시간, 50 시간, 52 시간, 54 시간, 56 시간, 58 시간, 60 시간, 62 시간, 64 시간, 66 시간, 68 시간, 70 시간, 72 시간, 74 시간, 76 시간, 78 시간, 80 시간, 82 시간, 84 시간, 86 시간, 88 시간, 90 시간, 92 시간, 94 시간, 96 시간, 98 시간, 100 시간, 102 시간, 104 시간, 106 시간, 108 시간, 110 시간, 112 시간, 114 시간, 116 시간, 118 시간, and 120 시간을 포함한다. CD24는 이전의 CD24 치료 이후의 어느 시점에서 투여될 수 있다. 어느 시점은, 약 120 시간, 118 시간, 116 시간, 114 시간, 112 시간, 110 시간, 108 시간, 106 시간, 104 시간, 102 시간, 100 시간, 98 시간, 96 시간, 94 시간, 92 시간, 90 시간, 88 시간, 86 시간, 84 시간, 82 시간, 80 시간, 78 시간, 76 시간, 74 시간, 72 시간, 70 시간, 68 시간, 66 시간, 64 시간, 62 시간, 60 시간, 58 시간, 56 시간, 54 시간, 52 시간, 50시간, 48 시간, 46 시간, 44 시간, 42 시간, 40 시간, 38 시간, 36 시간, 34 시간, 32 시간, 30 시간, 28 시간, 26 시간, 24 시간, 22 시간, 20 시간, 18 시간, 16 시간, 14 시간, 12 시간, 10 시간, 8 시간, 6 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간, 1 시간, 55 분, 50 분, 45 분, 40 분, 35 분, 30 분, 25 분, 20 분, 15 분, 10 분, 9 분, 8 분, 7 분, 6 분, 5 분, 4 분, 3 분, 2 분, and 1 분을 포함한다.

[0042] 다음의 실시예들은 본 발명의 방법들을 설명하기 위해 제시되었으며 그 방법들의 사용을 제한하는 것은 아니다.

[0043] 실시예 1

[0044] **가용성 CD24 단백질**

[0045] CD24의 세포외 영역은 IgG1 Fc에 결합된다. CD24 융합 단백질 아미노산 조성물은 도 1에 도시되어 있다. 그리고, CD24 융합 단백질의 발현을 유도하는 복제-결합 레트로바이러스 벡터가 생성되었다. GPE<sub>x</sub><sup>TM</sup>(유전자 생성 발현에 대한 머릿글자) 시스템은 몇 가지 중요한 장점들을 제공하고 있다. 그 중에서 가장 중요한 것은 평균, > 1,000 insertions/cells(삽입/세포)이며, 그러나 단지 1 복사/삽입을 가지는 것이다. 게다가, 레트로바이러스는 우선적으로 전사 활성 위치로 삽입되므로, GPE<sub>x</sub><sup>TM</sup>은 타겟이 되는 단백질에 대한 높은 수준의 발현을 실현하였다. CD24Ig의 높은 수율(high yield)을 생성하는 안정된 세포 라인들이 발생되었다. 게다가, 45 그램의 GLP 등급 생성물과 ~100 그램의 cGMP 등급 생성물들이 생성되었다. 바이오리액터(bioreactor)로부터 얻어지는 매질(media)의 다운스트림 공정(downstream processing)을 위해 사용되는 방법은 첨부된 흐름도에 요약되어 있다(도 2).

[0046] **생성물의 정제(Harvest Clarification)**

[0047] 바이오리액터 배양 매질은 Cuno 60M01 Maximizer 깊이 필터들에 의해 정제된 후에, Millipore Opticap 0.22 μm 필터에 의해 더 정제되었다. 여액은 멸균 수집백에 수집되었다. 샘플들은 ELISA에 의하여 정량적으로 CD24-Fc로서 얻어졌다.

[0048] **단백질 A 수확**

[0049] 정제된 매질은 수지의 16g/L을 초과되지 않는 농도로(ELISA에 근거함), 단백질 A 수지(GE 헬스케어 MabSelect)의 컬럼을 통과시켰다. 컬럼은 평형 버퍼(50mM Tris + 0.15M NaCl pH7.5)로 세척된 후에, 5cvs동안 10mM 구연산 나트륨/시트르산 pH 6.0으로 세척하였다. 결합된 CD24는 10mM 나트륨 구연산염/시트릭산 pH 3.5를 이용하여 컬럼으로부터 용출하였다.

[0050] **바이러스 불활성화(Viral Inactivation)**

[0051] 단백질 A 용출물 분획을 즉시 2M 염산을 가하여 pH 3.0으로 조절하고, 주위온도에서 30분 동안 유지시켰다. 그 후에, 1M Tris 염기를 첨가하여 pH 5.0로 조절한 다음, 0.65 μm 유리 섬유 필터(Sartorius Sartopure GF2)와 0.2 μm(Sartorius Sartopure 2)를 사용하여 여과하여 정제한 다음, 멸균 수집 백(steril collection bag)에 수집하였다.

[0052] **SP-세파로즈(Sepharose) 칼럼크로마토그래피**

[0053] 바이러스 불활성화된 물질을 수지 25g/L을 초과하지 않는 농도(1.22=1mg/mL의 A280nm에 근거함)와 250cm/hr의 선형 유속으로 SP-세파로제(GE 헬스케어)의 컬럼에 적용하였다. 컬럼은 평형 버퍼(10mM 나트륨 구연산염/시트릭산 pH 5.0)로 세척하고, 결합된 CD24Ig는 10mM 구연산 나트륨/시트르산 + 0.2M NaCl pH 5.0을 이용하여 컬럼으로부터 용출한다. 용출물은 멸균 수집 백에 수집하였다.

[0054] **무스탕(Mustang) Q 칼럼크로마토그래피**

[0055] SP-세파로즈 용출물을 1M Tris 염기를 첨가하여 pH 7.5로 조절한 다음, WFI로 희석하여 전도성을 감소시켰다. 희석된 물질은, 수지 0.5g/L을 초과하지 않는 농도(1.22=1mg/mL의 A280nm에 근거함)와 5 컬럼 volumes/min의 유속으로 무스탕 Q 필터(PALL)에 적용하였다. 필터는 평형 버퍼(10mM Tris pH 7.5)로 세척하였으며, CD24-Fc는 그 유속내에 포함되어 있으며, 멸균 수집백에 수집하였다.

[0056] **바이러스 여과**

- [0057] 무스탕 Q의 흐름은 다음에 0.2mM 필터와 Millipore NFP 바이러스 필터(공칭 구멍 크기 20nm)를 통해 30psi의 일정한 압력에서 여과하고, 멸균 수집 백에 수집하였다.
- [0058] **농도 및 최종 조성물**
- [0059] 생성물은 농축하고, 10kDa 울트라 여과막(Millipore Prep/Scale)을 이용하여 철저하게 여과하고, 280nm의 흡광에 의해 결정된 약 10mg/mL의 최종 농도로, 10mM 나트륨 인산염, 150mM 나트륨 염화물 pH7.2에 넣었다. 분석용 샘플들은 바이오 안전 캐비닛(biosafety cabinet)에서 벌크로부터 꺼내었다. 라벨링(labeling)을 실행하고, 샘플들은 QC에 실험용으로 보내고, 벌크 알리콧(aliquot)은 방출용으로 2-8℃의 온도에 저장된다.
- [0060] **바이러스 제거(Clearance) 연구**
- [0061] CHM에서 제조된 샘플들에 대하여 Cardinal Health, NC에서 바이러스 제거 밸리데이션을 수행하였다. Cardinal Health 사람의 도움으로 Cardinal Health 밸리데이션 시설에서 Gala Biotech의 품질과학자들이 크로마토그래피와 여과 공정들을 수행하였다. 스케일 다운 공정을 200L 스케일 공정으로부터 개발하였다. 첫째는 제노트로픽 뮤린 백혈병 바이러스(Xenotropic murine Leukemia virus)이고, 두 번째는 포르신 파르보바이러스(Porcine Parvovirus: PPV)이며, 이것은 레트로비리다에 바이러스 족(Retroviridae viral family)의 18-26nm 크기의 외피막 RNA 바이러스이다. 이것은 로버스트 바이러스(robust virus)로 생각되며, XMuLv보다는 정제 프로토콜을 통한 더 낮은 바이러스 리덕션을 나타내는 것으로 기대된다.
- [0062] **실시예 2**
- [0063] **RA의 치료를 위한 CD24Fc의 용도**
- [0064] 이 실시예는 CD24가 RA를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 예시한다. 항-콜라겐 항체는 질병이 시작되기 이전에, RA 환자들에게 나타나며, 그리고 항-콜라겐 항체는 마우스의 내부에서 RA-유사성 병리 현상을 유발할 수 있으므로, RA에 대한 설정된 수동적 전달 모델이 가용성 CD24의 효능을 시험하는데에 사용되었다. 용합 단백질은 PBS 매질내에 10mg/mL의 농도로 용해하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 4개의 항-콜라겐 항체들의 조합은 모든 수족들 내에서 심각한 임상적 증상들을 발생시켰으며, 이러한 증상들은 담체(vehicle)와 CD24Fc로 치료된 그룹들에서 모두 7일째에 가장 심각하게 나타났다. 그 질병은 모든 수족들(limbs)내에서 발생하는 발(paw) 전체의 부종과 발적 현상(redness)을 특징으로 하고 있다. 손가락들과 다수의 관절들을 포함하는 몇 개의 수족들은 그 상태가 최대한 악화된다. 그러므로, 가용성 단백질은 질병의 시작에 영향을 미치지 않는다. 놀랍게도, CD24Fc로 치료한 그룹은 더욱 빠른 회복을 보여주고 있다. 임상적인 수치들의 감소는 9일째가 매우 중요하며, 24일간의 전체 관찰 기간 동안에 지속된다. 그러므로, CD24Fc는 RA에 대한 효과적인 치료를 제공한다. 흥미 있는 것은, 그 효과가 질병의 가장 심각한 상태 이후에 관찰되므로, CD24를 블로킹하는 것(blocking)은 염증의 초기 이후에 장기간의 질병 과정에 영향을 미치게 된다.
- [0065] **실시예 3**
- [0066] **CD24의 약물동력학(Pharmacokinetics)**
- [0067] 1mg의 CD24IgG1이 순수한 C57BL/6종 마우스내에 주사되었으며, 각각의 시점에서 3마리 마우스에 대해 다른 시점(5분, 1시간, 4시간, 24시간, 48시간, 7일, 14일과 21일)에서 혈액 샘플들을 수집하였다. 혈청은 1:100을 희석되었으며, CD24Ig의 레벨들은 정제된 항-인체 CD24(3.3 µg/ml)를 포착 항체(capturing antibody)로 이용하고, 페록시다제 복합(conjugated) 염소 항-인간 IgG Fc(5 µg/ml)을 검출 항체로 이용하는 샌드위치(sandwich) ELISA에 의해 검출되었다. 도 5a에 도시된 바와 같이, CD24Ig의 붕괴(decay) 곡선은 단백질의 전형적인 바이페이즈(biphasic) 붕괴를 나타내고 있다. 첫 번째 생분포(biodistribution) 단계는 12.4 시간의 반감기를 가지고 있었다. 두 번째 단계는 중아부로부터 일차 제거의 모델을 따르고 있다. 두 번째의 반감기는 9.54일이 되었으며, 이것은 생체내의 항체의 반감기와 유사하다. 이러한 데이터는 용합 단백질이 혈액 순환시에 안정적이라는 것을 나타내고 있다. 용합 단백질이 피하조직으로 투입된 다른 연구들에서는, 거의 동일한 반감기인 9.52일이 관찰되었다(도 5b). 더욱 중요한 것은, CD24Ig가 혈액내에서 피크 레벨(perak level)에 도달

하기 위해서는 48시간이 걸렸으므로, AUC에 의해 측정된 바와 같이, 전체 투입경로에 의해 공급되는 혈액내의 용합 단백질의 전체 양은, 실질적으로 동일하였다. 그러므로, 치료학적인 관점에서 살펴보면, 다른 투입 경로는 그 약품의 치료 효과에 영향을 끼치지 않아야 한다. 이러한 관찰은 영장류 독성과 임상학적 실험을 위한 시험 계획을 현저하게 단순화시키게 되었다.

[0068] 실시예 4

[0069] RA의 치료용 CD24

[0070] 수십 년 동안에, RA는 거의 T-세포 매개(mediated)에 의한 자동면역 질병이라고 생각되었다. 지난 20년 동안에는, RA 발병학에서 항체들과 B 림프구에 대한 가능한 역할에 대해 다시 한 번 관심을 가지게 되었다. 그러므로, 류마티즘 인자들 외에도, 많은 자동반응(autoresponsive) 항체들은, RA 환자들내에서 발견되었다. 하지만, RA는 인체내에서는 확실하게 고쳐지지 않았다. 그러나, 몇 가지 증거 라인들은, 마우스 모델들에서, 유비쿼터스(ubiquitous) 또는 조직 특정 항원에 대한 특정 항체들이 RA 증상들을 발생시키는데 충분하다는 것을 입증하였다. 예를 들면, K/BxN TCR 형질 변환 마우스로부터 얻어진 항체들은 새로운 숙주(host)내에서 RA-유사 질병들을 충분히 전달할 수 있다는 것이 발견되었다. 마찬가지로, 4개의 항-콜라겐 항체들에 대한 칵테일(cocktail)은 마우스에게 RA를 유발시키기 위해서 널리 사용되고 있다. 이러한 모델은 콜라겐 항체-유도성 관절염(collagen antibody-induced arthritis), 즉 CAIA라고 불리운다.

[0071] CAIA 모델의 유전학적 분석은 보충을 위한 중요 역할을 나타내고 있다. 다른 가능성들도 존재하지만, 이러한 요구 사항들은 RA 발병학에서 항체-매개에 의한 조직 손상의 잠재적 포함을 제시하고 있다. 조직 손상과 염증과의 연관성은 면역학에서 오래 동안 관찰된 사항이다. 거의 20년 전에는, Matzinger가 소위 위험 이론이라는 것을 제안하였다. 본질적으로, 그녀는 면역 시스템이 숙주내에서 위험들을 감지하게 되는 경우에, 그 면역 시스템이 작동하게 된다는 것을 주장하였다. 위험의 성격이 그 당시에는 정확하게 정의되어 있지 않았지만, 괴사(necrosis)는 위험-관련 분자 패턴(danger-associated molecular patterns), 즉 DAMP라고 불리우는, HMGB1과 열-충격(heat-shock) 단백질과 같은 세포내 구성 요소들의 방출(release)과 관련이 있다는 것이 판명되었다. DAMP는 염증성 시토킨과 자동면역 질병의 발생을 촉진한다는 것이 발견되었다. 동물 모델들에서는, HMGB1과 HSP90의 억제제들이 RA를 개선시킨다는 것(ameliorate)이 발견되었다. DAMP의 포함은 DAMP에 대한 숙주 응답과 관련하여, 부정적인 조절이 RA 치료를 위해 노출될 수 있다는 예측을 제기하게 되었다.

[0072] 조직 손상에 대한 숙주 반응(host response)에서 CD24-Siglec 10 상호 작용

[0073] 간 괴사를 유발하는 아세트아미노펜(acetaminophen)을 사용하고 염증을 확인할 때, 우리는 상호 작용 Siglec G를 통해, CD24는 조직 손상에 대한 숙주 반응(Host response)에 대해 강력한 음성조절(negative regulation)을 제공하는 것을 관찰했다. CD24는 크게 조혈 세포와 다른 조직 줄기세포로 표시되는 GPI 고정 분자(anchored molecules)이다. 다발성 경화증(multiple sclerosis), 전신성 홍반성낭창(systemic lupus erythematosus), RA, 그리고 거대 세포 관절염(giant cell arthritis)을 포함하는 인간의 자기 면역 질환의 다양한 유전자 분석은 CD24 다형성과 면역 질환의 위험 사이에 상당한 연관 관계를 보여 주었다. Siglec G는 구조를 포함하는 시알산(sialic acid)을 인식하는 능력에 의해 정의 된 I-렉틴 계(I-lectin family)의 일원이다. Siglec G는 CD24에 대한 구조를 포함하는 시알산을 인식하고 수지상 세포(dendritic cells)(16)에 의해 염증성 시토킨(inflammatory cytokines)의 생산을 부정적으로(억제적으로) 조절하고 있다. CD24와 상호 작용하는 능력의 측면에서, 인간 Siglec 10과 마우스 Siglec G는 기능적으로 동일하다. 그러나, 마우스와 인간 상동(human homologues) 사이에 일대일 상관 관계가 있는 경우, 그것은 명확하지 않다. 메커니즘은 전체 해명(elucidated)되어 남아 있지만, SiglecG - 관련 SHP1는 부정적인(억제적인) 조절에 관여될 수도 있다는 것이다. 최근 과학에 보고된, 이러한 데이터는, CD24-Siglec G/10 상호 작용이 DAMP(도 6)에서 차별의 중요한 병원체-관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern) (PAMP)을 재생할 수 있는 새로운 모델로 이어질지 모른다.

[0074] 적어도 두 개의 중복 메커니즘이 CD24의 기능을 설명할 수 있다. 첫째, 다양한 DAMP를 결합하여, CD24는 TLR또는 RAG와 상호 작용을 방지하기 위해 염증 자극(inflammatory stimuli)을 추적할 수 있다. 이 개념은 CD24가 HSP70, 90, HMGB1및 뉴클레오린(nucleolin)을 포함하는 몇몇의 DAMP 분자와 연관된다는 관찰에 의해 지원된다. 둘째, 아마도 DAMP와 연관된 후, CD24는 Siglec G.에 의한 신호(signaling)를 촉진할 수 있다. 양 메커니즘은 훨씬 더 강력한 염증 반응이 증가(mounted)되는 두 유전자의 타겟된 돌연변이(targeted mutation)가 있

는 마우스와 보조를 맞출 것이다. 사실, CD24<sup>-/-</sup> 또는 Siglec G<sup>-/-</sup> 마우스로부터 골수(bone marrow)에서 배양된 DC는 HSP70, HMGB1 또는 HSP90들 중 어느 하나에 자극 받을 때, 매우 높은 염증성 시토킨(cytokines)을 생산했다. 반면, LPS와 PolyLC와 같은 PAMP에 대한 그들의 반응에서 어떤 효과도 찾을 수 없었다. 이러한 데이터는 조직 손상으로부터 병원체를 구별 할 수 있는 본래 면역 시스템에 대한 메커니즘을 제공할 뿐만 아니라 이러한 조직 손상과 관련된 질병에 대한 잠재적인 치료 대상으로 CD24와 Siglec G를 암시한다.

**[0075] 콜라겐-항체-유도 관절염에 CD24Fc의 치료 효과**

**[0076]** RA의 발병(pathogenesis)에서 조직 손상에 대한 선천적 면역에 대한 의심되는 역할(suspected role)과 그러한 반응에 부정적인 조절에 CD24-Siglec G/10 경로에 대한 역할이 주위된다면, RA 치료를 위해 이 경로를 자극할 가능성이 분석된다. 기본적으로 모든 면역 질환의 발병은 자가항원(autoantigen) 및 자가면역(autoimmune) 파괴에 대한 면역 반응의 유도를 포함한다. 자가면역 파괴 단계는 CD24-Siglec G 상호 작용의 독창적 기능(novel function)을 바탕으로 집중되었다. 따라서 예비 분석을 위해, 콜라겐 항체 유도 관절염 모델(collagen antibody-induced arthritis model)은 잠재적인 치료 효과를 평가하기 위해 채택되었다.

**[0077]** 도 7a에 도시된 바와 같이, CAIA는 하루에 2mg/mouse로 4 항-콜라겐 mAbs(MD Biosciences, St. Paul, MN)의 각테일의 정맥주사와 3일에 LPS(MD Bioscience)의 100ug/mouse의 I.p 투여에 의해 8주가 된 BALB/c 마우스에 유도된다. 마우스는 1mg CD24Fc 또는 네가티브 컨트롤(negative control)로서 1xPBS 담체(vehicle)의 동등한 양으로 1일 치료되었다. 도 7b에 도시된 바와 같이, 담체 대조군(vehicle control)에 비해, CD24Fc는 매우 두드러진 치료 효과를 제공했다.

**[0078]** CD24Fc가 이 모델에서 관절염을 감소하는 메커니즘을 이해하기 위해서는, 시토킨은 CD24Fc치료 마우스 또는 PBS 대조군(control group)의 균질화된 관절(homogenized joints)에서 측정되고, 시토킨 비즈 배열(beads array)에 의해 200 µg 조직 호모지네이트(homogenates)의 상등액(supernatant)을 측정했다. 전형적인 예는 도 8a에 도시됐고, 요약 데이터를 도 8b에 도시했다. 이러한 데이터는 체계적으로 관리된(administrated) CD24는 TNF-α, IL-6, MCP-1(CCL2)와 IL-1β를 포함하는 복합(multiple) 염증성 시토킨의 수준(level)을 감소한다는 것을 증명했다.

**[0079]** 도 9에 제시된 바와 같이, CD24Fc의 효과가 CAIA 마우스의 활액 관절(synovial joints)의 조직학적 분석(histological analysis)에 의해 입증되고 있다. 관절염의 유도 후 7일에, H & E 염색(staining)은 PBS그룹 내 관절 활(액)막(joint synoviums)은 호중구(neutrophil), 대식세포(macrophage) 및 림프구(lymphocytes) (도 9a)를 포함하는 염증세포(inflammatory cells)로 심하게 침투되는 것이 증명되었다. 이것은 CD24Fc 처리 마우스에서 많이 감소했다(도 9b). 또한, 절단(sever) 연골 손상은 PBS-처리(도 9c) 마우스에서, 그러나 CD24Fc-처리 그룹(도 9d)은 아닌, 사프란닌(safranin) O 적색 염색(O red staining) 손실에 의해 나타났다.

**[0080]** 마우스, CD24Fc이 진행 RA에 대한 치료 효과를 가지는지를 확인하기 위하여, 치료는 RA의 유도 후 5일 또는 7일 중에 시작되었다. 도 10에 도시된 바와 같이, RA 스코어의 상당한 감소는 CD24Fc 치료 후 2일째로 관찰되었다. 치료 효과는 추가 치료 없이 남은 관찰기간 동안 지속되었다. 이 데이터는 지속적인 질병에 CD24Fc의 치료 가능성을 더 강화해준다.

**[0081]** 인간에 있어 CD24Fc의 치료 용량을 평가하기 위해, CD24Fc가 다양한 용량의 범위를 통해 적정 되었다. 도 11에 도시된 바와 같이, 2 µg/마우스는 통계적으로 상당한 치료 효과를 갖는 것으로 충분하다.

**[0082] CD24Fc의 Siglecg-의존성(dependent) 치료 효과**

**[0083]** CD24Fc가 Siglec G와 상호작용하여 마우스를 보호하는지 여부를 결정하기 위해, 우리는 Siglecg 유전자에 의존하는지를 결정했다. Siglecg-결핍 마우스가 C57BL/6 마우스에서 ES세포를 생산하고 있기 때문에, 우리는 대조군(control)으로 WT C57BL/6 마우스를 사용했다. 도 12에 도시한 바와 같이, B6 마우스가 CAIA에 덜 감수성인 것으로 알려졌기 때문에, 전체 질병 스코어(score)는 BALB/C 마우스에서 관찰된 것보다 낮다. 그럼에도 불구하고, CD24Fc의 단일 주사는 기본적으로 WT마우스의 임상 증상을 제거하였다. 중요한 것은, 질병이 Siglecg-결함 마우스에서 덜 심각할지라도, CD24Fc는 치료 효과가 없다는 것이다. 따라서, CD24Fc의 치료 효과는 Siglecg 유전자에 따라 절대적으로 의존적이다.

**[0084]** 모든 점에서 미루어볼 때, 여기에 기술된 데이터는 CAIA에 대한 CD24Fc의 높은 치료 효능을 보여준다. 안전에



대한 우리의 광범위한 데이터들 감안할 때, 안정성과 우리의 CD24Fc 성공적인 제조는 모두 RA에 대한 치료로서 융합 단백질(fusion protein)의 많은 잠재력을 암시한다.

[0085] 실시예 5

[0086] 독성

[0087] 설치류(rodent)와 비-인간 영장류(non-human primates)의 광범위한 독성 연구는 마우스 및 비-인간 영장류에 12.5-125 mg/kg 투여에서 약물 관련 독성을 나타내지 않았다.

[0088] 인용문헌

- [0089] 1. Springer, T., G. Galfre, D.S. Secher, and C. Milstein. 1978. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol* 8:539-551.
- [0090] 2. Pierres, M., P. Naquet, J. Barbet, S. Marchetto, I. Maries, C. Devaux, M. Barad, R. Hyman, and G. Rougon. 1987. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J1 Id is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Eur J Immunol* 17: 1781-1785.
- [0091] 3. Rougon, G., L.A. Alterman, K. Dennis, X.J. Guo, and C. Kinnon. 1991. The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hemolymphoid and neural cell lineages. *Eur J Immunol* 21: 1397-1402.
- [0092] 4. Liu, Y., and C.A.J. Janeway. 1992. Cells that present both specific ligand and the costimulatory activity are the most efficient inducer of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3845-3849.
- [0093] 5. Liu, Y., B. Jones, A. Aruffo, K.M. Sullivan, P.S. Linsley, and C.A. Janeway, Jr. 1992. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 175:437-445.
- [0094] 6. Liu, Y., B. Jones, W. Brady, C.A. Janeway, Jr., P.S. Linsley, and P.S. Linley. 1992. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1993 Mar;23(3):780]. *Eur J Immunol* 22:2855-2859.
- [0095] 7. Liu, Y., R.H. Wenger, M. Zhao, and P.J. Nielsen. 1997. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185:251-262.
- [0096] 8. Wu, Y., Q. Zhou, P. Zheng, and Y. Liu. 1998. CD28 -independent induction of T helper cells and immunoglobulin class switches requires costimulation by the heat-stable antigen. *J Exp Med* 187: 1151-1156.
- [0097] 9. Bai, X.F., J.Q. Liu, X. Liu, Y. Guo, K. Cox, J. Wen, P. Zheng, and Y. Liu. 2000. The heat-stable antigen determines pathogenicity of self-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105: 1227-1232.
- [0098] 10. Bai, X.F., O. Li, Q. Zhou, H. Zhang, P.S. Joshi, X. Zheng, Y. Liu, Y. Wang, and P. Zheng. 2004. CD24 Controls Expansion and Persistence of Autoreactive T Cells in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* 200:447-458.
- [0099] 11. Otaegui, D., A. Saenz, P. Camano, L. Blazquez, M. Goicoechea, J. Ruiz-Martinez, J. Olaskoaga, J. A. Emparanza, and A. Lopez de Munain. 2006. CD24 V/V is an allele associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Spanish population. *Mult Scler* 12:511-514.
- [0100] 12. Rueda, B., J.A. Miranda-Filloy, J. Martin, and M.A. Gonzalez-Gay. 2008. Association of CD24 gene polymorphisms with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J. Rheumatol.* 35:850-854.
- [0101] 13. Sanchez, E., A.K. Abelson, J.M. Sabio, M.A. Gonzalez-Gay, N. Ortego-Centeno, J. Jimenez-Alonso,



E. de Ramon, J. Sanchez-Roman, M.A. Lopez-Nevot, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, G. Sturfelt, L. Truedsson, A. Jonsen, M.F. Gonzalez-Escribano, T. Witte, M.E. Alarcon-Riquelme, and J. Martin. 2007. Association of a CD24 gene polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56:3080-3086.

- [0102] 14. Wang, L., S. Lin, K. Rammohan, Z. Liu, J. Liu, R.-H. Liu, N. Guinther, Q. Zhou, T. Wang, X. Zheng, D.J. Birmingham, B.H. Rovin, L.A. Herbert, Y. Wu, D.J. Lynn, G. Cooke, C.Y. Yu, P. Zheng, and Y. Liu. 2007. A di-nucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *Plos Genetics* 3:e49.
- [0103] 15. Zhou, Q., K. Rammohan, S. Lin, N. Robinson, O. Li, X. Liu, X.F. Bai, L. Yin, B. Scarberry, P. Du, M. You, K. Guan, P. Zheng, and Y. Liu. 2003. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15041-15046.
- [0104] 16. Chen, G.Y., J. Tang, P. Zheng, and Y. Liu. 2009. CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses. *Science* 323: 1722-1725.
- [0105] 17. Wiens, A., R. Venson, C.J. Correr, M.F. Otuki, and R. Pontarolo. Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacotherapy* 30:339-353.
- [0106] 18. Panayi, G.S., J.S. Lanchbury, and G.H. Kingsley. 1992. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35:729-735.
- [0107] 19. Banda, N.K., J.M. Thurman, D. Kraus, A. Wood, M.C. Carroll, W.P. Arend, and V.M. Holers. 2006. Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 177: 1904-1912.
- [0108] 20. Korganow, A.S., H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, R. Pelanda, T. Martin, C. Degott, H. Kikutani, K. Rajewsky, J.L. Pasquali, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10:451-461.
- [0109] 21. Maccioni, M., G. Zeder-Lutz, H. Huang, C. Ebel, P. Gerber, J. Hergueux, P. Marchal, V. Duchatelle, C. Degott, M. van Regenmortel, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195: 1071-1077.
- [0110] 22. van Holten, J., K. Pavelka, J. Vencovsky, H. Stahl, B. Rozman, M. Genovese, A.J. Kivitz, J. Alvaro, G. Nuki, D.E. Furst, G. Herrero-Beaumont, LB. McInnes, P. Musikic, and P.P. Tak. 2005. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64:64-69.
- [0111] 23. Vilcek, J., and M. Feldmann. 2004. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in pharmacological sciences* 25:201-209.
- [0112] 24. Rantapaa-Dahlqvist, S., B.A. de Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U. Sundin, and W.J. van Venrooij. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2741-2749.
- [0113] 25. van Venrooij, W.J., and G.J. Pruijn. 2000. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis research* 2:249-251.
- [0114] 26. Jiang, W., and D.S. Pisetsky. 2007. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Nature clinical practice* 3:52-58.
- [0115] 27. van Beijnum, J.R., W.A. Buurman, and A.W. Griffioen. 2008. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 11:91-99.

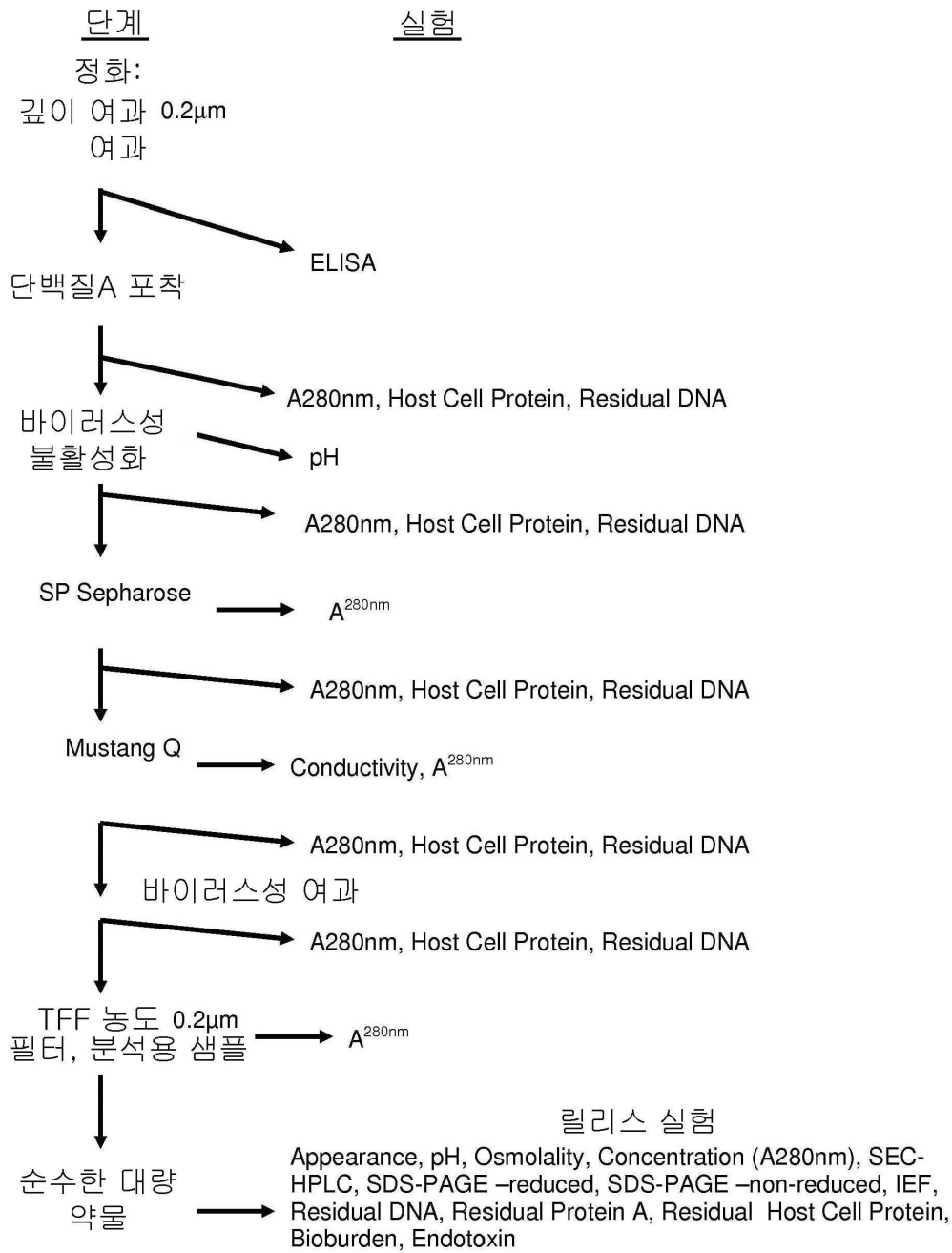
- [0116] 28. Sanchez, E., B. Fernandez-Gutierrez, M.A. Gonzalez-Gay, A. Balsa, A. Garcia, L. Rodriguez, D. Pascual-Salcedo, M.F. Gonzalez-Escribano, and J. Martin. 2008. Investigating the role of CD24 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 67: 1197-1198.
- [0117] 29. Kay, R., P.M. Rosten, and R.K. Humphries. 1991. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. J Immunol 147: 1412-1416.
- [0118] 30. Kay, R., F. Takei, and R.K. Humphries. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J1 ld heat-stable antigens. J Immunol 145: 1952-1959.
- [0119] 31. Motari, E., X. Zheng, X. Su, Y. Liu, M. Kvaratskhelia, M. Freitas, and P.G. Wang. 2009. Analysis of Recombinant CD24 Glycans by MALDI-TOF-MS Reveals Prevalence of Sialyl-T Antigen. American journal of biomedical sciences 1: 1-11.
- [0120] 32. Liu, Y. 1994. The costimulatory pathway for T cell response. RG Landes, Austin.

도면

도면1

MGRAMVARLGLGLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNGLAP  
 NPTNATTKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNGSTYRVVS  
 VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP  
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

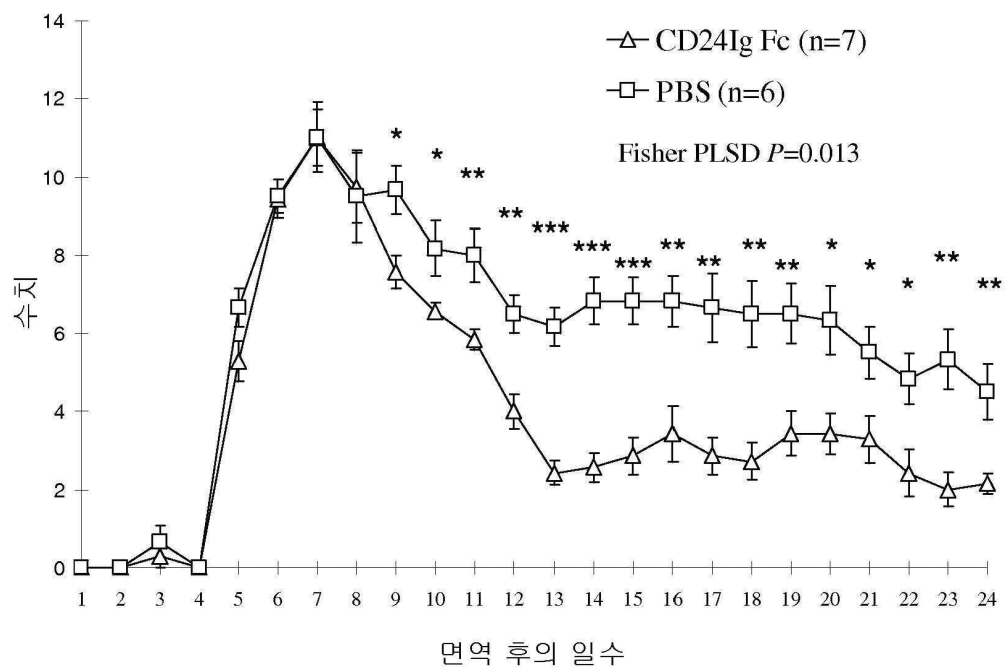
도면2



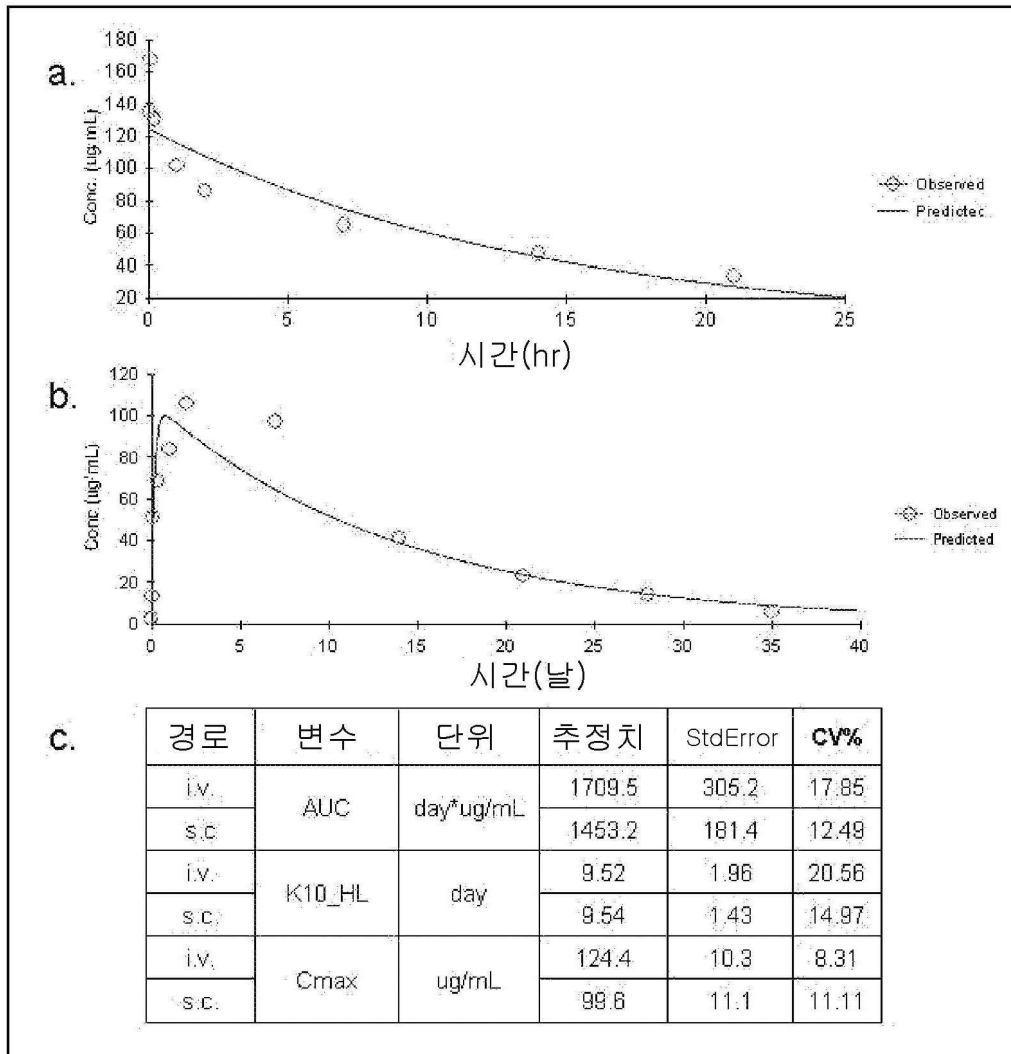
도면3

마우스 cd24 **NQTSVAPFPGN--QNISAS----**PNPT**NA**TTRG  
                   —\* —       \* \* \* \*       \* \* \* \* \* \* —  
 인간 CD24 **SETTTGTSS—NSSQSTSN**S—GLAPNP**TA**TTKA (V)

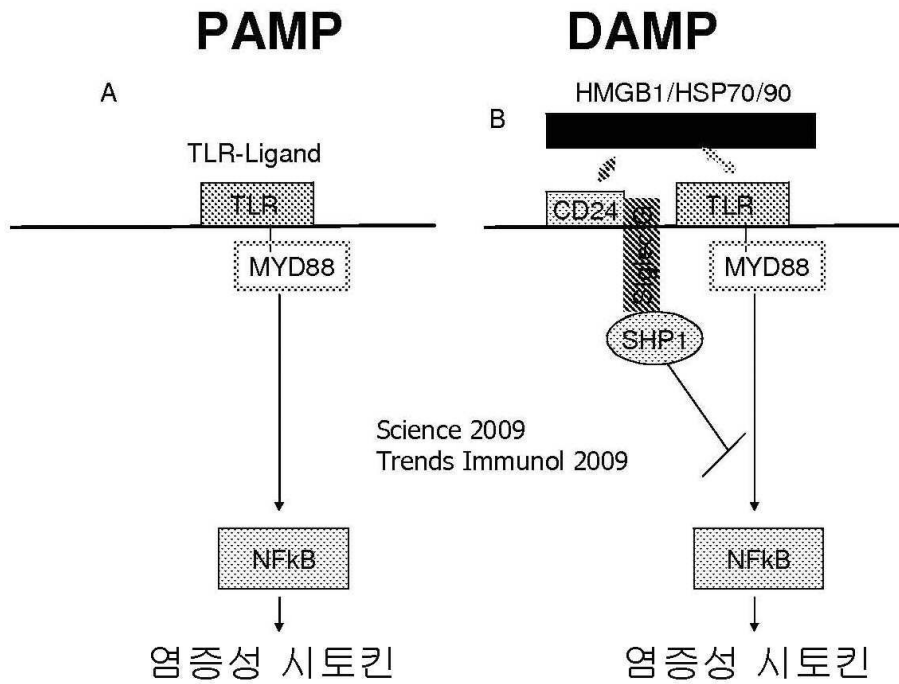
도면4



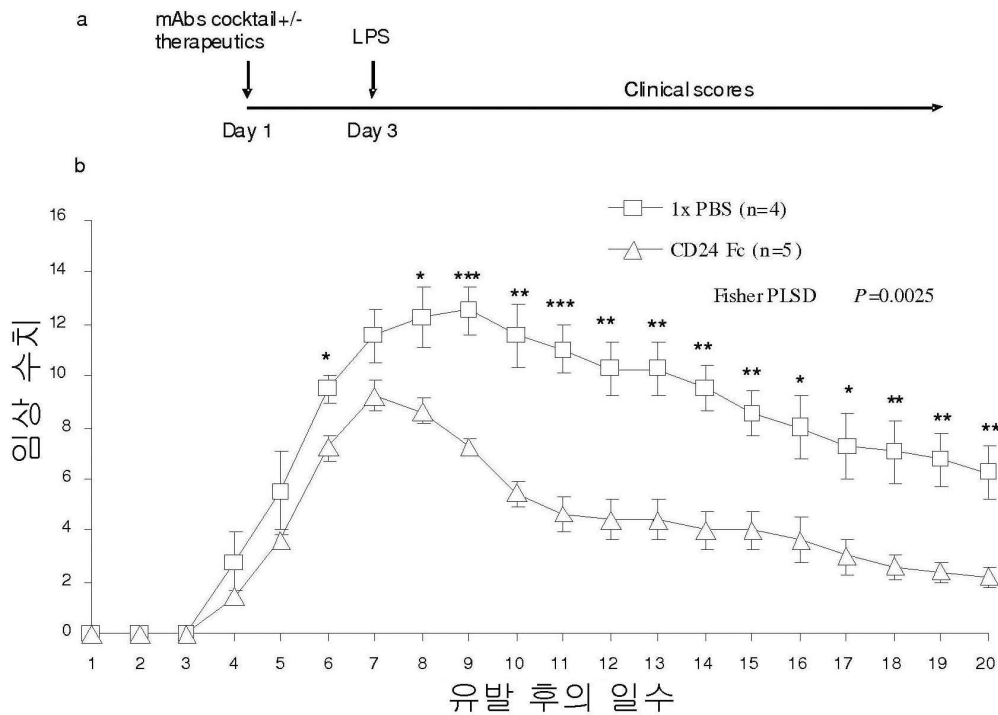
도면5



도면6

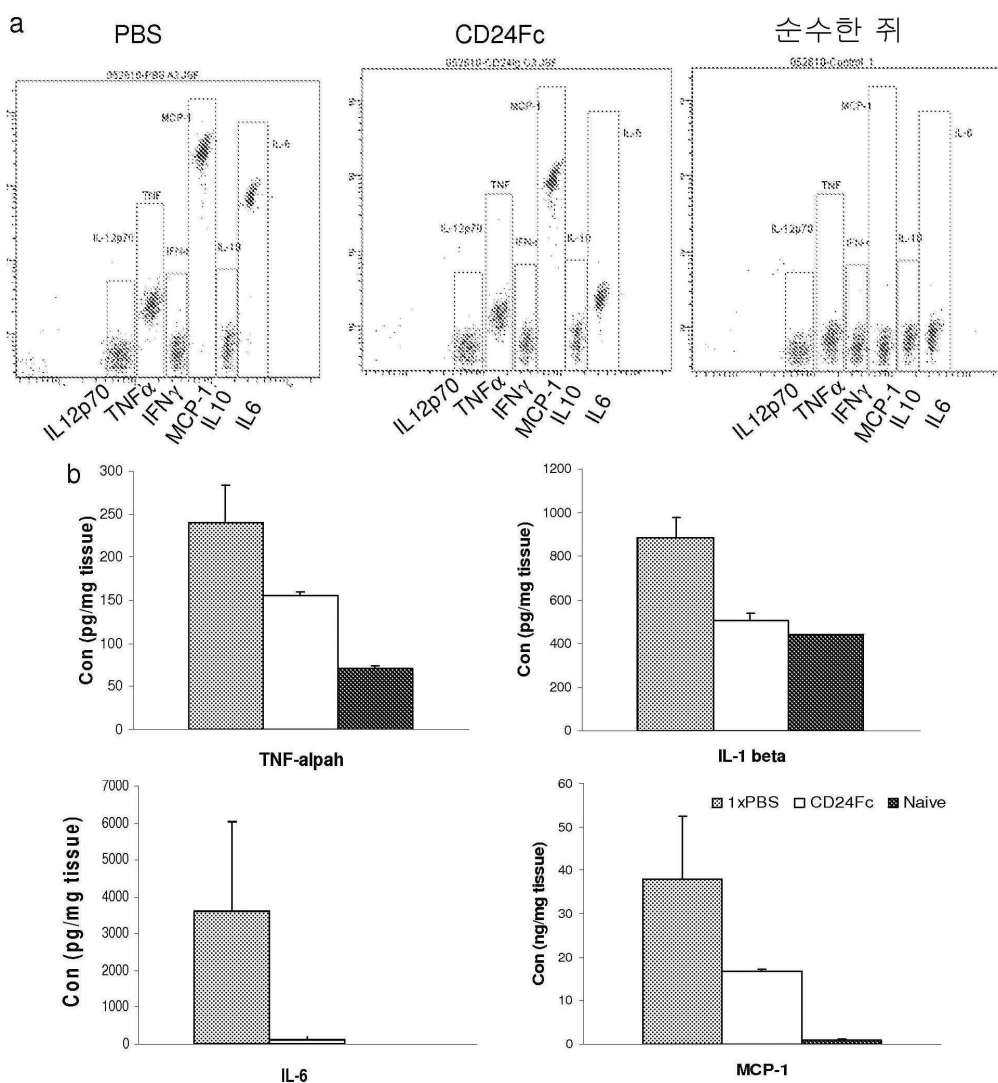


도면7

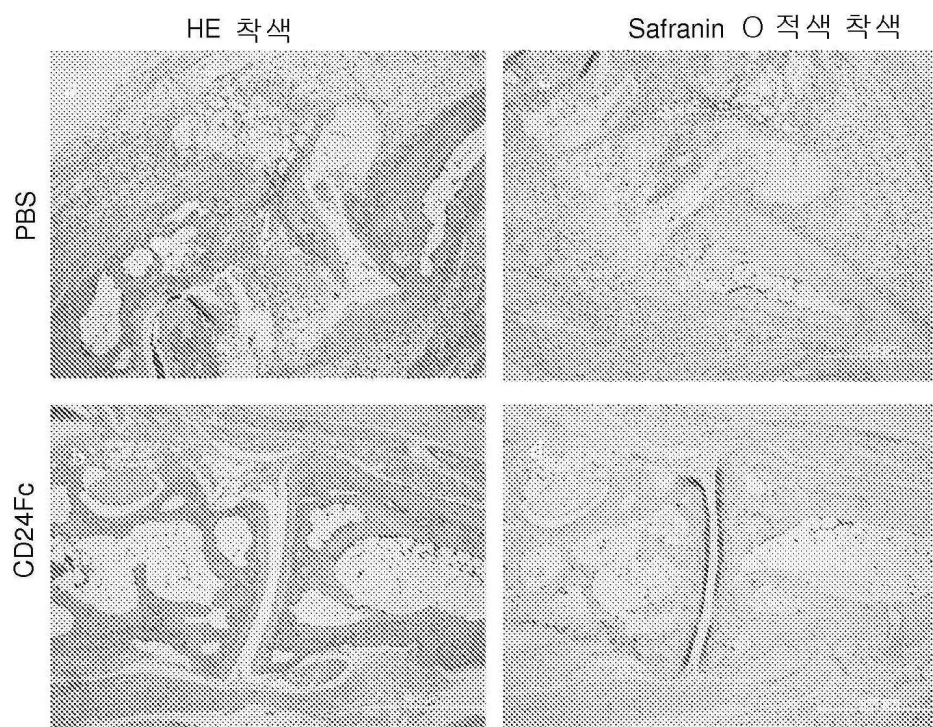




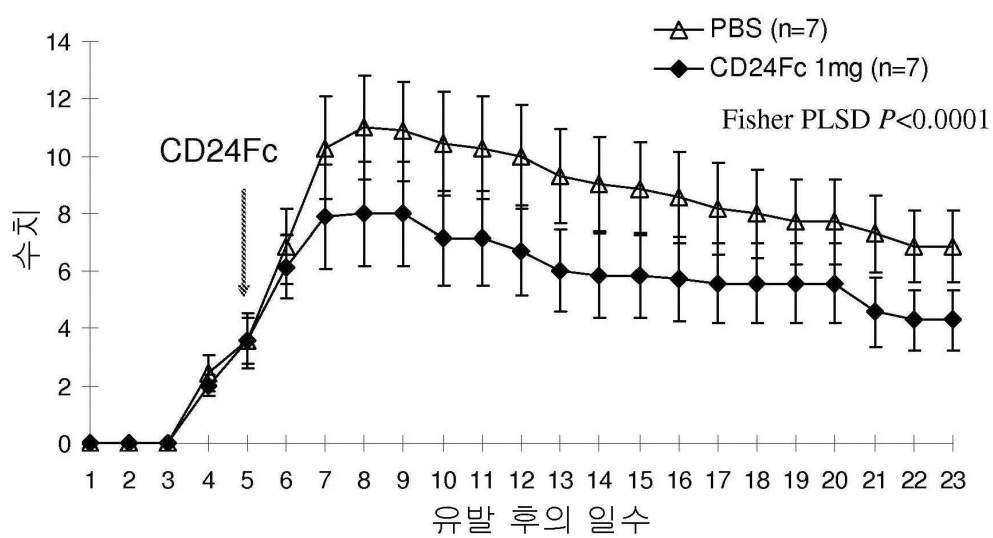
도면8



도면9

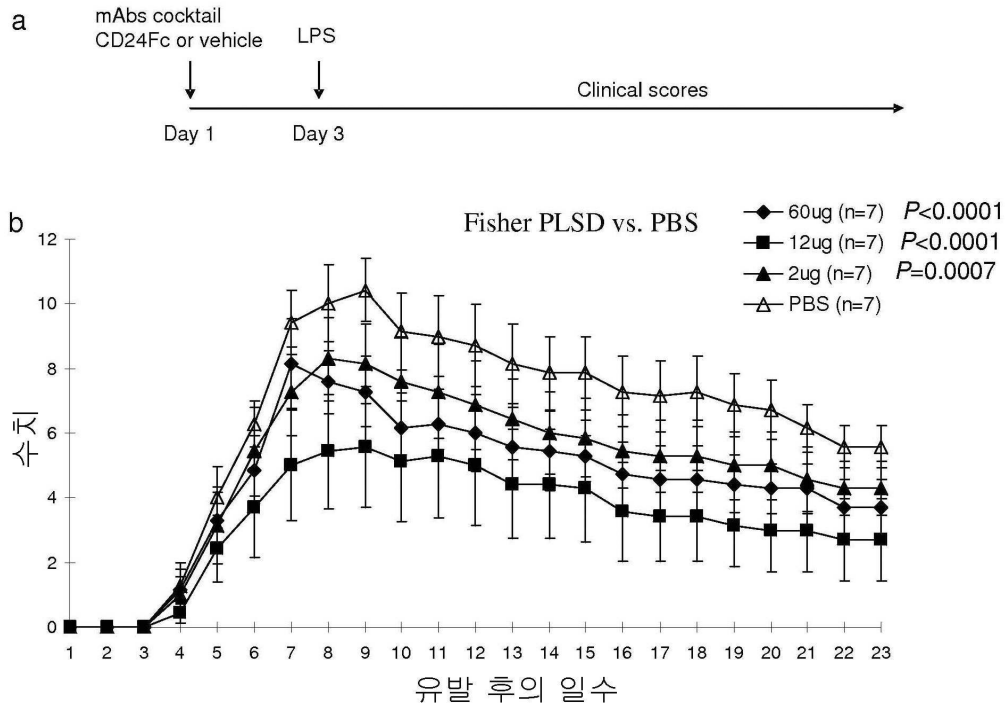


도면10

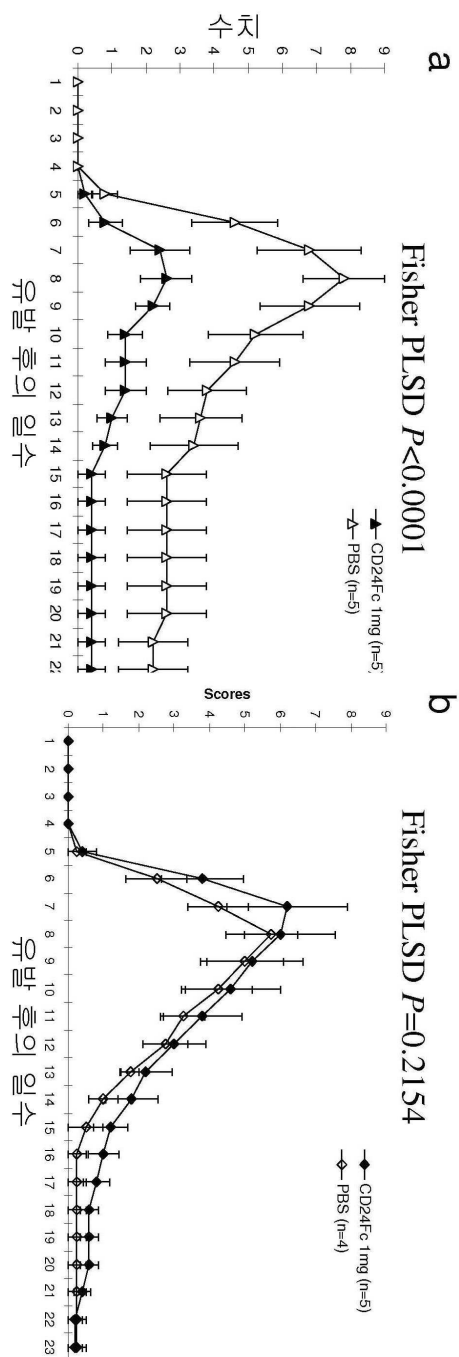


도면11

투여량에 따르는 CD24Fc의 치료효과



도면12



## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

<110> OncoImmune, Inc.

<120> METHODS OF USE OF SOLUBLE CD24 FOR THERAPY OF RHEUMATOID  
ARTHRITIS

<130> 060275.0400.01PC00

<150> 61/329,078

<151> 2010-04-28

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys

20 25 30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> Xaa

<222> (31)..(31)

<223> Val or Ala

<400> 2

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Xaa

20 25 30

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asn Gln Thr Ser Val Ala Pro Phe Pro Gly Asn Gln Asn Ile Ser Ala

1 5 10 15

Ser Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Arg Gly

20 25

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Ser

20 25

<210> 5

<211> 287

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD24 IgG1 Fc fusion

<400> 5

Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Ser Ser Glu Thr Thr Thr Gly

20 25 30

Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser Asn Ser Gly Leu Ala Pro

35 40 45

Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

50 55 60

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

65 70 75 80

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

85 90 95

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

115 120 125

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser



130 135 140  
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
145 150 155 160  
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
165 170 175

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
180 185 190  
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
195 200 205  
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
210 215 220  
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
225 230 235 240

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
245 250 255  
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
260 265 270  
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
275 280 285

<210> 6

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

1 5 10 15  
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
20 25 30  
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
35 40 45  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230