



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0120145
(43) 공개일자 2018년11월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/177 (2013.01)
A61P 3/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7022125
- (22) 출원일자(국제) 2017년02월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년07월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/016120
- (87) 국제공개번호 WO 2017/136492
국제공개일자 2017년08월10일
- (30) 우선권주장
62/290,202 2016년02월02일 미국(US)
- (71) 출원인
온쿄이뮨, 아이엔씨.
미국, 메릴랜드 20850, 록빌, 스위트 113, 키 웨스트 애비뉴 9430
- (72) 발명자
리우, 양
미국 워싱턴 D.C. 20002, 스트리트 NE, 502 E 쟁, 판
- (74) 대리인
데븐포트, 마틴
미국, 20878 메릴랜드, 게이더스버그, 614 스톤 크리크 레인
- (74) 대리인
신관호

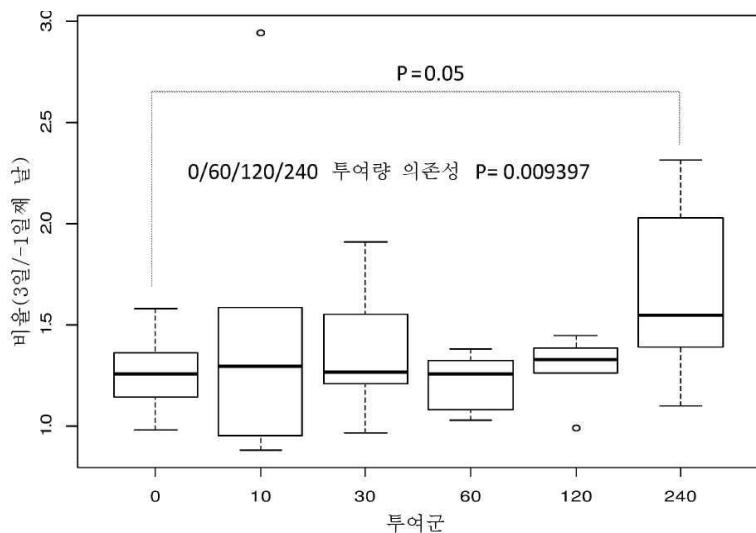
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 렙틴-결핍 병태를 치료하기 위한 CD24 단백질의 용도

(57) 요약

본 발명은 순환하는 렙틴의 수준을 증가시킴으로써 지방이영양증과 같은 렙틴-결핍 병태를 치료하기 위한 CD24 단백질의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07K 14/70596 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

피험체의 혈류 중에 순환하는 렙틴 수준을 증가시키기 위한 방법으로서, CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피험체는 렙틴이 감소된, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 피험체는 지방이영양증(lipodystrophy)을 갖는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 피험체는 HIV를 갖는, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 피험체는 항바이러스 요법(antiviral therapy)을 받은, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 성숙한 인간 CD24 또는 이의 변이체의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 성숙한 인간 CD24는 서열번호 1 및 2의 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 인간 CD24의 세포외 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 CD24 단백질은 단백질 태그(protein tag)를 더 포함하되, 상기 단백질 태그는 상기 CD24 단백질의 N-말단 또는 C-말단에서 융합되는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단백질 태그는 포유동물 면역글로불린(Ig)의 일부를 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 Ig의 일부는 인간 면역글로불린의 Fc 일부인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 Fc 일부는 상기 인간 Ig 단백질의 헌지 영역(hinge region) 및 CH2 도메인과 CH3 도메인을 포함하고, 상기 Ig는 IgG1, IgG1, IgG3, IgG4 및 IgA로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 Fc 일부는 IgM의 헌지 영역 및 CH3 도메인과 CH4 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 서열번호 6의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 진핵생물 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산되는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 발현 시스템은 중국 햄스터 난소 세포주(Chinese Hamster Ovary cell line)에 함유된 백터를 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 서열번호 4의 신호 서열을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 신호 펩티드 서열은 천연 단백질 서열 및 기능적으로 동등한 변이체(functionally equivalent variant) 중 하나로부터 채택되는, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 가용성인, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 CD24 단백질은 글리코실화(glycosylation)되어 있는, 방법.

청구항 21

피험체에서 지방이영양증 증후군을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

HIV를 갖는 피험체에서 지방이영양증을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

항바이러스 요법을 받았던 피험체에서 지방이영양증 증후군을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

피험체의 혈류 중에 순환하는 렙틴 수준을 증가시키기 위한 방법으로서, 서열번호 6의 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

피험체에서 지방이영양증 증후군을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 서열번호 6의 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

HIV를 앓고 있는 피험체에서 지방이영양증을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 서열번호 6의 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

항바이러스 요법을 받았던 피험체에서 지방이영양증 증후군을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 서열번호 6의 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 렙틴-결핍 병태를 치료하는데 사용하기 위한 CD24 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

렙틴 유전자의 돌연변이로 인해 야기된 렙틴 결핍, 시상하부성 월경불순(hypothalamic amenorrhea) 및 지방이영양증 증후군(lipodystrophy syndrome; LS)과 같은 렙틴-결핍 병태(leptin-deficient condition)는 지방 조직 및 지방 조직으로부터 유래한 호르몬(중요하게도 대부분이 렙틴임)의 부분적 또는 완전 결여를 특징으로 한다 [문헌(Rodriguez 등, 2015)]. 이들 질환에서 피하 지방 조직이 가장 많은 영향을 받으며, 지방은 비지방 조직에 축적한다. 지방위축(lipoatrophy)은 하나의 구역(통상, 얼굴)으로부터의 지방의 손실을 설명하는 경우에 사용되는 보다 구체적인 용어이다. 렙틴이 결핍된 환자는 고혈당증(hyperglycemia), 고중성 지질혈증(hypertriglyceridemia) 및 간지방증(hepatic steatosis)과 같은 다수의 심각한 대사 이상을 나타내며, 이들 대사 이상은 각각 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 급성 장염(acute pancreatitis) 및 간경변증(hepatitis cirrhosis)으로 진행될 수 있다. 지방이영양증은 골경화증(osteosclerosis)으로 이어질 수도 있다.

[0003]

전신성 지방이영양증은 지방이영양증의 가장 현저한 형태이며, 후천적 또는 선천적일 수 있다. 후천적 지방이영양증은 또한 고도 활성 항레트로바이러스 요법(HAART)의 사용으로부터 발생하거나 근원적인 HIV 감염(지방이영양증의 가장 일반적인 형태) 또는 자가 면역 병태(autoimmune condition)로부터 발생할 수 있다. 지방이영양증의 선천적 형태의 발병은 지방세포 분화, 지질 소적 형태학(lipid droplet morphology) 및 지질 대사를 조정하는 몇몇 유전자 내의 문자 결핍에 의해 결정된다.

[0004]

LS에 대한 임상 소견은 본질적으로는 낫거나 검출 불가능한 수준의 지방-유래 사이토카인 렙틴을 초래하는 백색 지방 조직의 부분적 또는 완전 결여에 의해 결정된다. 이전에 렙틴은 글루코오스 항상성(glucose homeostasis), 인슐린 민감성 및 지방산 산화를 포함한 몇몇 대사 과정을 조절하는 아디포사이토카인(adipocytokine)으로서 공지되어 있다. 지방이영양증에서 관측되는 렙틴 결핍 상태는 몇몇 대사 이상의 발생을 초래하며, 지방이영양증을

앓고 있는 환자들 중 약 80%는 대사 증후군에 대한 진단 기준을 만족시킨다.

[0005] 지방이영양증과 같은 렙틴-결핍 병태에 대한 현재 입증된 치료 방법은 렙틴 유사체인 메트레렙틴(metreleptin; MYALEPT)을 이용하는 것과 같은 렙틴 대체 요법(LRT)을 포함한다. 그러나 LRT는 중화 항-약물 항체 및 럼프종의 발생에 관련된 위험성과 연관이 있으며, 이는 현재 전신성 비-HIV 지방이영양증의 사례에 대해서만 승인되어 있다. 더욱이, 이의 낮은 반감기로 인해 메트레렙틴은 천연 렙틴의 생체 주기(circadian cycle)를 모방하기 위해 1일 1회 또는 2회(통상 동일한 시간대) 투여될 수 있다. 따라서 특히 HIV를 앓고 있는 환자에 있어서 LS 및 렙틴 결핍을 치료하는 대안적인 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에 투여함으로써 피험체에서 렙틴-결핍 병태를 치료하기 위한 신규한 방법이 개시되어 있다. 본 발명은 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 피험체에 투여함으로써 HIV를 앓고 있는 환자에서 지방이영양증을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 또한 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] CD24 단백질은 성숙한 인간 CD24 또는 이의 변이체의 서열을 포함할 수 있다. 상기 성숙한 인간 CD24는 서열번호 1 또는 2의 서열을 포함할 수 있다. 상기 CD24 단백질은 인간 CD24의 세포외 도메인 일부 또는 모두를 포함할 수 있다. 상기 CD24 단백질은 상기 단백질을 발현하는 세포로부터의 분비를 허용하기 위해 서열번호 4의 신호 서열을 포함할 수 있다. 상기 신호 펩티드 서열은 기타 막통과 또는 분비 단백질 상에서 발견되는 서열일 수 있거나, 또는 당해 기술분야에 공지된 기존의 신호 펩티드로부터 변형된 서열일 수 있다. 상기 CD24 단백질은 가용성일 수 있고/있거나 글리코실화(glycosylation)될 수 있다. 상기 CD24 단백질은 진핵생물 단백질 발현 시스템을 이용하여 생성될 수 있으며, 이때 상기 발현 시스템은 중국 햄스터 난소 세포주에 함유된 벡터 또는 복제-결합 레트로바이러스성 벡터를 포함할 수 있다. 상기 복제-결합 레트로바이러스성 벡터는 진핵세포의 게놈(genome) 내로 안정적으로 통합될 수 있다.

[0008] 상기 CD24 단백질은 단백질 태그를 포함할 수 있으며, 이때 상기 단백질 태그는 상기 CD24 단백질의 N-말단 또는 C-말단에서 융합될 수 있다. 상기 단백질은 포유동물 면역글로불린(Ig)의 일부를 포함할 수 있으며, 이때 상기 Ig의 일부는 인간 Ig 단백질의 Fc 일부일 수 있다. 상기 인간 Ig 단백질은 상기 인간 Ig 단백질의 헌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있고, 상기 인간 Ig 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA일 수 있다. 상기 Fc 일부는 또한 IgM의 헌지 영역 및 CH3 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. 상기 CD24 단백질은 서열번호 5, 6, 8 또는 9의 서열을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1a는 전장 CD24 융합 단백질인 CD24IgG1Fc(본원에서 CD24Fc로도 지칭됨)(서열번호 5)의 아미노산 조성을 나타낸다. 밑줄 친 26개의 아미노산은 CD24의 신호 펩티드(서열번호 4)로서, 상기 단백질을 발현하는 세포로부터의 분비 도중에 개열(cleavage)되어 제거되며, 따라서 상기 단백질의 성숙한 형태(서열번호 6)로부터 손실된 상태이다. 상기 서열의 볼드체 부분은 융합 단백질에 사용된 성숙한 CD24 단백질의 세포외 도메인(서열번호 2)이다. 상기 성숙한 CD24 단백질에 통상 존재하는 마지막 아미노산(A 또는 V)은 면역원성(immunogenicity)을 피하기 위해 구조체로부터 결실되어 있다. 밑줄이 없고 볼드체가 아닌 문자는 헌지 영역 및 CH1 및 CH2 도메인을 포함한 IgG1 Fc의 서열(서열번호 7)이다. 도 1b는 CD24^AFc의 서열(서열번호 8)을 나타내며, 여기서 성숙한 인간 CD24 단백질(볼드체)은 서열번호 1의 발린 다형성 변이체이다. 도 1c는 CD24^AFc의 서열(서열번호 9)을 나타내며, 여기서 성숙한 인간 CD24 단백질(볼드체)은 서열번호 1의 알라닌 다형성 변이체이다. 도 1a 및 도 1b에서의 상기 융합 단백질의 다양한 부분은 도 1a에서와 같이 표시되어 있으며, 상기 변이체 발린/알라닌 아미노산은 이중으로 밑줄 쳐져 있다.

도 2는 전처리 1일 전과 비교한, CD24Fc 처리 후 3일째 날에 건강한 인간 피험체의 혈청 중 렙틴의 비율을 나타낸다. 약물을 0일째 날에 투여되었다. 데이터는 CD24Fc 투약 집단(dosing cohort)으로 나타내고; 0mg/kg 그룹은 플라시보(placebo) 대조군을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

이하, 본 발명자들은 CD24 단백질을 인간 피험체에 투여하면 혈액 중에 순환하는 렙틴의 수준이 증가하게 된다는 놀라운 발견을 개시하고 있다. 이는 순환하는 렙틴 수준을 증가시킴으로써 지방이영양증과 같은 렙틴-결핍 병태의 치료에 유용하다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 HIV를 앓고 있는 환자에서 지방이영양증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0011]

본원에서 보다 상세하게 개시한 바와 같이, CD24는 조혈세포 및 비조혈세포 중에서 광범위하게 발현되는 소형 글리코실-포스파티딜-아노시톨(GPI)-고정 당단백질로서, 240개의 염기쌍으로 이루어진 코딩 서열(coding sequence)에 의해 암호화되어 있다. 80개의 아미노산 중 최초 26개는 신호 웨티드를 구성하는 반면, 마지막 23개는 GPI 테일(GPI tail)의 부착을 허용하기 위해 개열용 신호로서 작용한다. 그 결과, 상기 성숙한 인간 CD24 분자는 단지 31개의 아미노산을 갖는다. 상기 성숙한 CD24 단백질 내의 31개의 아미노산 중 마지막 (C-말단) 아미노산은, 인간 피험체군 사이에서 다형성을 나타낸다. 226번째 뉴클레오티드에서 C에서 T로의 변이는 발린(v)에 의한 알라닌(a)의 치환을 초래한다. 이러한 잔기가 개열 부위에 대해 바로 N-말단에 있기 때문에, 그리고 상기 대체(replacement)가 비-보존적이기 때문에, 이들 2개의 대립 형질(allele)은 세포 표면 상에서 서로 다른 효율로 발현될 수 있다.

[0012]

CD24는 다발성 경화증(MS), 류머티스성 관절염(RA) 및 전신 홍반성 낭창(SLE)에 대한 유전적 변경인자(genetic modifier)인 것으로 알려져 있다. 피험체군 수준에서, $CD24^{v/v}$ 유전자형은 정상적인 피험체군에서보다 2배 더 높은 빈도를 갖는다. 복합 MS 부류들 중에서 $CD24^v$ 대립 형질은, 건강한 대조군에 비해 MS 환자에 우선적으로 전달된다. 더욱이, 보다 심각한 형태의 질병[환자가 독립 보행 능력을 잃은 경우에 6.0 또는 그 초과의 확장 장애 상태 척도(EDSS)]을 갖는 환자들 중에서, $CD24^{v/v}$ 피험체는 첫 번째 임상적 증상으로부터 6.0의 EDSS에 도달하는데 평균 7년 걸렸지만, $CD24^{a/v}$ 또는 $CD24^{a/a}$ 피험체는 13년 내지 15년 내에 6.0의 EDSS에 도달하였다. 반대로, CD24 mRNA 안정성을 감소시켜 CD24 발현을 감소시키는 CD24 메신저 리보핵산(mRNA)의 3' 비번역 영역에서의 디뉴클레오티드 결실은, MS 및 기타 자가 면역 질환에 대해 인간을 보호한다. 지금까지는 CD24는 지질 수준에 영향을 미치는 것으로는 나타나지 않았다.

1. 정의

[0014]

본원에서 사용된 용어는 특정 실시형태만을 설명할 목적일 뿐, 제한적인 것으로 의도되는 것은 아니다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명확하게 언급하지 않는 한 단수 형태는 복수의 대상을 포함한다.

[0015]

본원에서의 수치 범위의 제한에 있어서, 동일한 정밀도로 그 사이에 있는 중간 숫자 각각이 명백히 고려된다. 예를 들어, 6~9의 범위에 있어서 6 및 9 이외에도 7 및 8의 숫자가 고려되며, 6.0~7.0의 범위에 있어서 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0의 숫자가 명백히 고려된다.

[0016]

"펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결 서열이며, 천연 또는 합성, 또는 천연 또는 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0017]

"실질적으로 동일한"은 제 1 및 제 2 아미노산 서열이 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개 또는 300개 아미노산의 영역에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다는 것을 의미할 수 있다.

[0018]

질병으로부터 인간 또는 동물의 보호를 지칭하는 경우에 "치료" 또는 "치료하기"는 상기 질병의 예방, 억제, 저해 또는 완전한 제거를 의미한다. 상기 질병을 예방한다는 것은 상기 질병의 발병 이전에 본 발명의 조성물을 인간 또는 동물에 투여하는 것을 포함한다. 상기 질병을 억제한다는 것은 상기 질병의 유도 이후지만 이의 임상적 양상(clinical appearance) 이전에 본 발명의 조성물을 인간 또는 동물에 투여하는 것을 포함한다. 상기 질병을 저해한다는 것은 상기 질병의 임상적 양상 이후에 본 발명의 조성물을 인간 또는 동물에 투여하는 것을 포함한다.

[0019]

"변이체"는 아미노산의 삽입, 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 다르지만, 일부 생물학적 활성을 보유하는 웨티드 또는 폴리웨티드를 의미할 수 있다. CD24에 대한 "생물학적 활성"의 대표적인 예로는 렉틴(lectin), 특히 Siglec(시알산-결합 면역글로불린형 렉틴)에 결합하는 능력, 및 특정 항체에 의해 결합될 능력을 들 수 있다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 기준 단백질에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 하나의 아미노산을 유사한 특성(예를 들어, 하전된 영역의 친수성, 정도 및 분포)을 갖는 다른 아미노산으로 대체하는 것은 당해 기술분야에서 전형적으로는 소변화(minor change)를 포함하는 것으로 인지된다. 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 이들 소변화는 아미노산의 수치요법 지수(hydropathic index)를 고려함으로써 부분적으로 확인될 수 있다. 아미노산의 수치요법 지수는 이의 소수성 및 전하를 고려하는 것에 기반을 두고 있다. 유사한 수치요법 지수를 갖는 아미노산이 치환될 수 있고, 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있는 것으로 당해 기술분야에 공지되어 있다. 일 양태에서, ±2의 수치요법 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 단백질이 생물학적 기능을 보유하도록 할 수 있는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 웨티드의 맥락에서 아미노산의 친수성을 고려하면 항원성 및 면역원성과 밀접한 연관성이 있는 것으로 보고된 유용한 척도인 이러한 웨티드의 가장 큰 국소 평균 친수성을 계산할 수 있게 된다. 본원에서 참고로 인용된 미국 특히 제 4,554,101호를 참고한다. 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 보유한 웨티드를 초래할 수 있다. 서로에 대해 ±2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산을 이용하여 치환을 수행할 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값 둘 모두는 이러한 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 이러한 관측과 일치하게도, 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 기타 특성에 의해 나타난 바와 같이 생물학적 기능과 양립 가능한 아미노산 치환은 아미노산의 상대적 유사성에 의존하고, 특히 이들 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다.

[0020]

2. CD24

[0021]

본원에서는 성숙한 인간 CD24의 아미노산 서열 또는 기타 포유동물에서 유래한 아미노산 서열을 포함할 수 있는 CD24 단백질이 제공되며, 이때 상기 CD24 단백질은 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 변이체에 상응한다. 상술한 바와 같이, 상기 성숙한 인간 CD24 단백질의 서열은 31개의 아미노산 길이를 가지며, 이때 이의 C-말단에 있는 알라닌(a)이 발린(v) 잔기로 변경 가능하다:

[0022]

SETTGTSNNSQSTSNSGLAPNPTNATTK(V/A)(서열번호 1)

[0023]

상기 C-말단 발린 또는 알라닌은 면역원성일 수 있으며, 상기 CD24 단백질로부터 생략되어 이의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 따라서, 다른 실시형태에서 사기 CD24 단백질은 C-말단 아미노산이 결여된 아미노산 서열 또는 성숙한 인간 CD24를 포함할 수 있다:

[0024]

SETTGTSNNSQSTSNSGLAPNPTNATTK(서열번호 2)

[0025]

마우스 및 인간에서 유래한 성숙한 CD24 단백질의 아미노산 서열에서의 상당한 서열 변이에도 불구하고, 인간 CD24Fc가 마우스에서 활성인 것으로 나타났기 때문에 이들은 기능적으로 동등하다. 상기 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열이 마우스 단백질에 대해 일부 서열 보존을 나타낸다(39% 동일성; 유전자은행 수탁 번호(Genbank accession number): NP_033976). 그러나 CD24 ECD가 종에 따라 단지 27개 내지 31개의 아미노산 길이를 갖기 때문에 상기 동일성(%)은 높지 않으며, Siglec 10/G와 같은 이의 수용체(들)의 일부에 대한 결합이 이의 시알산 및/또는 상기 당단백질의 갈락토오스 당에 의해 매개된다는 것이 그렇게 놀라운 일은 아니다. 상기 인간 Siglec-10(유전자은행 수탁 번호: AF310233)의 세포외 도메인과 이의 쥐 동종체 Siglec-G(유전자은행 수탁 번호: NP_766488) 수용체 단백질 사이의 아미노산 서열 동일성은 63%이다. 주로 C-말단 및 풍부한 글리코실화 부위 내에서 마우스와 인간 CD24 사이의 서열 보존의 결과로서, 특히 상기 성숙한 CD24 단백질에서의 유의한 변이가 C-말단에서 보존된 잔기에 영향을 미치지 않거나 마우스 및 인간 CD24 중 하나에서 유래한 글리코실화 부위에 영향을 미치지 않는 경우 이를 변이는 상기 CD24 단백질을 이용할 때 용인될 수 있다. 따라서 상기 CD24 단백질은 성숙한 쥐 CD24의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

[0026]

NQTSVAPFPGNQNISASPNPTNATTRG(서열번호 3)

[0027]

상기 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열은 시노몰구스 원숭이(cynomolgus monkey) 단백질에 대해 마우스보다 많은 서열 보존을 나타낸다(52% 동일성; 유니프로트(UniProt) 수탁 번호: UniProtKB-I7GKK1). 또한, 상기 ECD가 이들 종에서 단지 29개 내지 31개의 아미노산 길이를 갖기 때문에 상기 동일성(%)이 높지 않다는 것을 고려할 때, 그리고 이의 수용체(들)에 대한 결합 시에 당 잔기의 역할을 고려할 때 이는 놀라운 일이 아니다. 시노몰구스

Siglec-10 수용체의 아미노산 서열은 결정되지 않았지만, 인간과 붉은털원숭이(rhesus monkey) Siglec-10(유전자은행 수탁 번호: XP_001116352) 단백질 사이의 아미노산 서열 동일성은 89%이다. 따라서 상기 CD24 단백질은 또한 성숙한 시노몰구스 원숭이(또는 붉은털원숭이) CD24의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

[0028] TVTTSAPLSSNSPQNTSTTPNPANTTKA(서열번호 10)

[0029] 상기 CD24 단백질은 가용성일 수 있다. 상기 CD24 단백질은 상기 단백질을 발현하는 세포로부터의 분비를 허용하기 위해 N-말단 신호 웨티드를 더 포함할 수 있다. 상기 신호 웨티드 서열은 내생성 인간 CD24 신호 웨티드로부터 유래한 아미노산 서열인 MGRAMVARLGLGLLLLALLPTQIYS(서열번호 4)를 포함할 수 있다. 대안적으로는, 상기 신호 서열은 기타 막통과 또는 분비 단백질 상에서 발견되는 임의의 서열일 수 있거나, 당해 기술분야에 공지된 기준의 신호 웨티드로부터 변형된 서열일 수 있다.

a. 융합

[0031] 상기 CD24 단백질은 이의 N-말단 또는 C-말단에서 단백질 태그(protein tag)에 융합되며, 이때 상기 단백질 태그는 인간 또는 마우스일 수 있는 포유동물의 Ig 단백질의 일부를 포함할 수 있다. 상기 일부는 상기 Ig 단백질의 Fc 영역을 포함할 수 있다. 상기 Fc 영역은 상기 Ig 단백질의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 상기 Ig 단백질은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM 또는 IgA일 수 있다. 상기 Fc 일부는 인간 면역글로불린 G1(IgG1) 아이소타이프(isotype; 서열번호 7)를 포함할 수 있다. 상기 Ig 단백질은 또한 IgM일 수 있고, 상기 Fc 일부는 IgM의 힌지 영역 및 CH3 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. 상기 단백질 태그는 또한 GST, His 또는 FLAG를 포함할 수 있다. 융합 단백질을 제조하고 융합 단백질을 정제하기 위한 방법은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다.

[0032] 실시예에서 확인된 CD24Fc 융합 단백질의 구성에 대해 본 발명자들의 임상전 연구에 기초하여, 본 발명자들은 GPI 신호 개열 부위(서열번호 2) 이전의 마지막 다형성 아미노산이 결여된 30개의 아미노산의 고유의 CD24 분자의 절단된 형태(truncated form)를 이용하는 것을 선택하였다. 이러한 단백질은 인간 IgG1 Fc 도메인(서열번호 7)에 융합된다. 상기 전장 CD24Fc 융합 단백질은 서열번호 5로 제공되며(도 1), 상기 세포(즉, 개열되어 제거되는 신호 서열일 결여된 세포)로부터 분비된 CD24Fc 융합 단백질의 성숙한 형태는 서열번호 6으로 제공된다. IgG1 Fc에 융합된 성숙한 CD24(즉, 서열번호 1을 갖는 성숙한 CD24 단백질)의 가공된 다형성 변이체는 서열번호 11 또는 서열번호 12를 포함할 수 있다.

b. 생산

[0034] 본원에 개시된 CD24 단백질은 고도로 글리코실화될 수 있으며, 당 모이어티(sugar moiety)는 면역 세포 공자극(costimulation), Siglec(시알산-결합 면역글로불린형 렙틴)와의 상호작용 및 손상-연관 분자 패턴 분자(DAMP)와의 상호작용과 같은 CD24의 생물학적 활성에 관여할 수 있다. 상기 CD24 단백질은 진핵생물 발현 시스템을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 발현 시스템은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유동물 세포에서 백터로부터의 발현을 수반할 수 있다. 상기 시스템은 또한 진핵세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있는 복제-결합 레트로바이러스성 백터와 같은 바이러스성 백터일 수 있다. 상기 CD24 단백질은 또한 세포 게놈(cellular genome) 내로 통합되어 있는 백터 또는 백터의 일부로부터 CD24 단백질을 발현하는 안정된 세포주로부터 생산될 수 있다. 상기 안정된 세포주는 통합된 복제-결합 레트로바이러스성 백터로부터 상기 CD24 단백질을 발현할 수 있다. 상기 발현 시스템은 GPEX™일 수 있다.

c. 약학 조성물

[0036] 본원에 개시된 CD24 단백질은 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있는 약학 조성물에 함유될 수 있다. 상기 약학 조성물은 상기 CD24 단백질을 장기간 동안 안정하게 유지할 수 있는 용매를 포함할 수 있다. 상기 용매는 약 -20°C(-15 ~ -25°C)에서 적어도 66개월 동안 상기 CD24 단백질을 안정하게 유지할 수 있는 PBS일 수 있다. 상기 용매는 상기 CD24 단백질을 다른 약물과 함께 수용할 수 있다.

d. 복용

[0038] 상기 CD24 단백질의 투여량은 궁극적으로는 허용 가능한 독성 및 독성 및 임상 효능에 의한 투여량을 결정하기 위해 임상 시험을 통해 결정될 수 있다. 초기 임상적 투여량은 설치류 및 비-인간 영장류에서 약동학 및 독성 연구를 통해 추정될 수 있다. 상기 CD24 단백질의 투여량은 목적하는 렙틴 증가량 및 투여 경로에 따라 0.01mg/kg 내지 1,000mg/kg일 수 있고, 1 내지 500 mg/kg일 수 있다. 상기 CD24 단백질은 정맥내 주입 또는 피하 또는 벽내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 상기 투여량은 상기 피험체가 인간인 경우에 10~100,000 mg, 10~10,000

mg, 10~1,000 mg, 10~500 mg, 10~240 mg 또는 10~120 mg 범위일 수 있거나, 10mg, 30mg, 60mg, 120mg 또는 240 mg일 수 있다.

[0039] 3. 치료 방법

[0040] 상기 CD24 단백질은 렙틴 유전자에서의 기능저하 돌연변이(hypomorphic mutation) 또는 후생학적 사일런싱(epigenetic silencing), 시상하부성 월경불순 및 지방이영양증 증후군(LS)(지방위축을 포함함)으로 인해 렙틴 결핍과 같은 렙틴-결핍 병태를 앓고 있는 피험체와 같이 렙틴 수준의 증가를 필요로 하는 피험체에 투여될 수 있다. 더욱이, 상기 피험체는 후천적 또는 선천적인 전신성 지방이영양증을 가질 수 있다. 후천적 지방이영양증은 고도 활성 항레트로바이러스 요법(HAART)을 이용하는 이들 피험체 또는 근원적인 HIV 감염(지방이영양증의 가장 일반적인 형태) 또는 자가 면역 병태를 앓고 있는 이들 피험체를 포함한다. 선천적 지방이영양증은 지방세포 분화, 지질 소적 형태학 및 지질 대사를 조정하는 임의의 몇몇 유전자 내의 문자 결핍을 갖는 이들 피험체를 포함한다. 상기 피험체는 인간과 같은 포유동물일 수 있다.

[0041] 상기 피험체는 렙틴 대체 요법(LRT)과 같은 렙틴 대체 약물 또는 혈액 내 렙틴 수준을 증가시키는 약물로 이전에 치료를 받았을 수 있다. LRT 요법의 특정한 예로는 렙틴 유사체인 메트레펩틴(Myalept; 미국 매사추세츠주의 케임브리지 소재의 애게리온 파마슈티컬즈 인코포레이션(Aegerion Pharmaceuticals, Inc.)이 있다.

[0042] a. 투여

[0043] 상기 약학 조성물의 투여 경로는 비경구적일 수 있다. 비경구 투여로는 관절 환부 내로의 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 척수강내, 관절내 및 직접 주사를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 수의학 용도에 있어서, 상기 약제는 정상적인 수의학 실습에 따라 적절히 허용 가능한 제형으로서 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 대해 가장 적절한 투여 양생법(dosing regimen) 및 투여 경로를 용이하게 결정할 수 있다. 상기 약학 조성물은 인간 환자, 고양이, 개, 대형 동물 또는 조류에 투여될 수 있다.

[0044] 상기 CD24 단백질은 기타 치료와 동시에 또는 정기적으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "동시의" 또는 "동시에"란 용어는 상기 CD24 단백질 및 기타 치료는 서로에 대해 48시간 이하, 바람직하게는 24시간 이하, 보다 바람직하게는 12시간 이하, 더욱 더 바람직하게는 6시간 이하 및 가장 바람직하게는 3시간 이하의 시간 이내에 투여될 수 있다는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "정기적으로"란 용어는 기타 치료와는 상이한 시간에 그리고 반복 투여 대비 특정 빈도로의 상기 약제의 투여를 의미한다.

[0045] 상기 CD24 단백질은 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분 및 1분을 포함한 다른 치료 이전의 어느 시점에 투여될 수 있다. 상기 CD24 단백질은 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분 및 1분을 포함한 상기 CD24 단백질의 두 번째 치료 이전의 어느 시점에 투여될 수 있다.

[0046] 상기 CD24 단백질은 약 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간, 28시간, 30시간, 32시간, 34시간, 36시간, 38시간, 40시간, 42시간, 44시간, 46시간, 48시간, 50시간, 52시간, 54시간, 56시간, 58시간, 60시간, 62시간, 64시간, 66시간, 68시간, 70시간, 72시간, 74시간, 76시간, 78시간, 80시간, 82시간, 84시간, 86시간, 88시간, 90시간, 92시간, 94시간, 96시간, 98시간, 100시간, 102시간, 104시간, 106시간, 108시간, 110시간, 112시간, 114시간, 116시간, 118시간 및 120시간을 포함한 다른 치료 이후의 어느 시점에 투여될 수 있다. 상기 CD24 단백질은 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분 및 1분을 포함한 상기 CD24 단백질의 두 번째 치료 이전의 어느 시점에 투여될 수 있다.

시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분 및 1분을 포함한 이전 CD24 치료 전 후의 어느 시점에 투여될 수 있다.

[0047] **b. 병용 치료**

[0048] 상기 CD24 단백질은 다른 약물, 또는 렙틴 대체 요법(LRT)과 같은 치료 양생법과 조합될 수 있거나, 혈액 내 렙틴 수준을 증가시키는 약물과 조합될 수 있다. LRT 요법의 특정한 예로는 렙틴 유사체인 메트레렙틴(Myalept; 미국 매사추세츠주의 케임브리지 소재의 애게리온 파마슈티컬즈 인코포레이션)이 있다. 상기 CD24 단백질 및 기타 약물을 함께 또는 연속적으로 투여될 수 있다.

[0049] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 예시된 다양한 양태를 갖는다.

[0050] **실시예**

[0051] 실시예 1

[0052] 본 실시예에 따르면 CD24Fc가 순환하는 렙틴 수준을 증가시키는 것으로 증명된다. 하기에 더욱 상세하게 설명된 임상 연구에서는, 기준선으로부터 혈장 내 렙틴의 변화를 분석하였다(본 실시예의 방법 부문 참고).

[0053] 루미넥스 비드-기반 면역검정(Luminex bead-based immunoassay)을 이용하여, CD24Fc 또는 플라시보를 투여받은 40명의 건강한 피험체로부터 치료 전 1일 및 투여 후 3일째 날에 수득된 80개의 시료에서 혈장 렙틴 수준을 결정하였다. 데이터는 표 1에 요약되어 있다. 표 1: 피험체 혈장 내의 렙틴 수준.

표 1

피험체 번호	집단	사료 추출일	복제물 1: 렙틴(pg/m ²)	복제물 2: 렙틴(pg/m ²)	평균: 렙틴(pg/m ²)
002	플라시보	-1일째	2,057.5	2,151.1	2,104.3
002	플라시보	3일째	3,101.0	2,603.7	2,852.4
003	10mg	-1일째	8,764.2	7,524.7	8,144.4
003	10mg	3일째	10,738.8	9,318.1	10,028.4
006	10mg	-1일째	3,205.3	3,461.2	3,333.2
006	10mg	3일째	4,919.7	5,651.1	5,285.4
009	10mg	-1일째	26,019.6	33,582.9	29,801.2
009	10mg	3일째	25,430.8	26,998.1	26,214.4
010	10mg	-1일째	3,657.9	3,961.1	3,809.5
010	10mg	3일째	4,705.2	5,613.2	5,159.2
008	10mg	-1일째	4,055.9	4,856.4	4,456.2
008	10mg	3일째	11,582.4	14,660.8	13,121.6
012	플라시보	-1일째	12,345.2	14,724.4	13,534.8
012	플라시보	3일째	14,293.5	17,111.0	15,702.3
016	10mg	-1일째	5,281.3	6,345.6	5,813.4
016	10mg	3일째	5,562.1	5,491.4	5,526.7
033	30mg	-1일째	7,906.4	8,295.2	8,100.8
033	30mg	3일째	15,080.8	15,884.3	15,482.5
042	플라시보	-1일째	3,795.8	4,013.6	3,904.7
042	플라시보	3일째	4,153.9	4,767.0	4,460.4
047	30mg	-1일째	11,751.1	13,536.1	12,643.6
047	30mg	3일째	14,161.9	16,374.2	15,268.1
062	플라시보	-1일째	4,022.3	4,668.0	4,345.2
062	플라시보	3일째	5,699.2	6,002.9	5,851.0
060	30mg	-1일째	13,672.4	16,908.8	15,290.6
060	30mg	3일째	18,703.5	19,928.7	19,316.1
063	30mg	-1일째	6,375.7	7,636.9	7,006.3
063	30mg	3일째	8,173.2	9,556.2	8,864.7
066	30mg	-1일째	15,790.3	17,753.7	16,772.0
066	30mg	3일째	24,460.6	27,606.1	26,033.3
067	30mg	-1일째	2,141.7	1,618.8	1,880.2
067	30mg	3일째	1,908.2	1,721.9	1,815.0
088	플라시보	-1일째	2,389.5	1,932.3	2,160.9
088	플라시보	3일째	2,273.8	2,305.3	2,289.6
090	60mg	-1일째	4,883.8	4,147.8	4,515.8
090	60mg	3일째	4,884.7	4,864.1	4,874.4
096	60mg	-1일째	6,991.8	6,135.6	6,563.7
096	60mg	3일째	9,448.9	8,672.7	9,060.8
105	60mg	-1일째	21,867.1	20,502.8	21,185.0
105	60mg	3일째	27,647.6	28,394.9	28,021.2
124	플라시보	-1일째	787.0	811.4	799.2
124	플라시보	3일째	1,038.7	1,140.8	1,089.8
129	60mg	-1일째	10,978.2	12,108.2	11,540.7
129	60mg	3일째	12,475.3	15,487.5	13,981.4
130	60mg	-1일째	10,948.9	13,845.4	12,397.2
130	60mg	3일째	14,237.8	18,069.0	16,153.4
131	60mg	-1일째	7,087.5	9,026.8	8,057.1

[0054]

피험체 번호	집단	치료 추출일	복제물 1: 렙틴(pg/ml)	복제물 2: 렙틴(pg/ml)	평균: 렙틴(pg/ml)
131	60mg	3일째	7,537.5	9,046.6	8,292.1
134	120mg	-1일째	27,893.0	31,498.7	29,695.9
134	120mg	3일째	38,629.1	43,787.4	41,208.2
149	플라시보	-1일째	494.4	386.1	440.3
149	플라시보	3일째	740.8	650.8	695.8
143	플라시보	-1일째	11,114.0	9,806.6	10,460.3
143	플라시보	3일째	13,506.2	10,982.0	12,244.1
147	120mg	-1일째	7,143.4	5,834.3	6,488.8
147	120mg	3일째	10,558.2	8,223.6	9,390.9
148	120mg	-1일째	1,890.8	1,432.5	1,631.7
148	120mg	3일째	2,193.1	1,930.4	2,061.7
157	120mg	-1일째	884.3	781.7	833.0
157	120mg	3일째	1,224.7	1,087.3	1,156.0
161	120mg	-1일째	6,576.9	5,863.6	6,220.3
161	120mg	3일째	8,689.1	7,117.7	7,903.4
171	120mg	-1일째	2,899.6	2,606.4	2,753.0
171	120mg	3일째	2,872.4	2,592.9	2,732.6
181	플라시보	-1일째	2,433.6	2,206.1	2,319.8
181	플라시보	3일째	2,384.8	2,171.0	2,277.9
212	플라시보	-1일째	6,780.4	6,600.6	6,690.5
212	플라시보	3일째	10,183.2	9,953.6	10,068.4
179	240mg	-1일째	19,575.6	20,203.2	19,889.4
179	240mg	3일째	29,443.7	30,264.3	29,854.0
213	240mg	-1일째	19.4	19.9	19.7
213	240mg	3일째	31.0	31.6	31.3
216	240mg	-1일째	321.2	326.1	323.7
216	240mg	3일째	448.1	453.2	450.6
211	240mg	-1일째	811.7	817.6	814.7
211	240mg	3일째	1,883.2	1,889.4	1,886.3
214	240mg	-1일째	888.5	887.8	888.1
214	240mg	3일째	981.2	976.5	978.9
218	240mg	-1일째	900.6	892.7	896.6
218	240mg	3일째	1,831.2	1,808.1	1,819.7

[0055]

분석 감도 및 검출 한계(LOD)는 표준 곡선[20개의 제로 표준 복제물(zero standard replicate)]으로부터 평균 배경(mean background)에 걸쳐 2개의 표준 편차가 있는 지점에서 산정된 값으로서 결정되었다. 정량 하한(LLQ Q)은 3회의 다른 라운드(round)에 대해 3회 분석된 표준 회석액 중의 표준물질의 일련의 2배 회석을 이용하여 결정되었으며, 상기 측정을 위한 변동 계수(CV)가 30%인 지점으로서 정의된다. 상기 CV는 농도에 대해 산정되고 플로팅(plotting)되었으며, LLQ는 플롯으로부터 내삽(interpolation)되었다. 상기 분석 성능 특성은 표 2의 하기와 같다.

표 2

피분석물	렙틴
단위	pg/ml
LOD	8.1
LLOQ	18.2
표준 곡선 범위	7.7 – 600,000

[0057]

도 2에는 투약 집단에 의해 그룹 형성된 환자에 대해 3일/-1일째 날에 렙틴의 비율이 표시되어 있다. 도면에 나타나 있는 바와 같이, CD24Fc 치료 이후 순환하는 렙틴의 상대적인 양에서의 상승 추세가 존재하며, 0mg, 60mg, 120mg 및 240mg 집단들 사이에 이러한 증가는 통계적으로 유의한데 [P = 0.009397; 투여량 의존적 일반적인 선형 모델 회귀(dose-dependent general linear model regression)], 이는 60mg 초과에서 투여량 의존적 증가를 증명하였다. 더욱이, 플라시보(0mg)와 비교하여 240mg 집단에서 CD24Fc 투여 이후에 렙틴 수준에서 통계적으로 유의한 증가가 존재하며 [P = 0.05; 스튜던트 T 검정(Student's T test)에 의해 결정], 이는 CD24Fc가 인간 환자에서 렙틴을 증가시키는데 효과적임을 보여준다.

[0059]

방법

[0060]

이는 건강한 남성 및 여성 성인 피험체에서 CD24Fc의 안전성, 내약성(tolerability) 및 PK를 평가하기 위한 단계 1의 연구로서, 본 연구는 무작위화되고, 이중 매검의 플라시보-조절되며, 단일 투여량이 증가한다. 각각 8명

의 피험체로 이루어진 5개의 집단에서 총 40명의 피험체가 본 연구에 등록하였다. 각 집단에서 8명의 피험체 중 6명은 연구 약물을 투여받았고, 2명의 피험체는 플라시보 (0.9% 염화나트륨, 식염수)를 투여받았다. 첫 번째 집단에는 10mg으로 투약되며, 후속 집단은 30mg, 60mg, 120mg 및 240mg의 CD24Fc을 투여받거나 이와 매치되는 플라시보(matching placebo)를 투여받았다. 투약은 고정량의 CD24Fc에 기반을 두었고, 중량 또는 BSA에 기반을 두고 이루어진 것은 아니다. 이전 집단 각각에 대해 안전성 및 내약성 데이터에 대한 검토하기 위해, 피험체에는 적어도 3주 간격으로 투약되었다. 적절한 안전성 및 내약성이 검증된 경우에만, 추후 더 많은 투여량을 새로운 피험체 집단에 투여하는 것이 허용되었다.

[0061] 각각의 집단에서, 첫째 날에 최초 2명의 피험체는 연구 약물 수여자(recipient) 1명 및 플라시보 수여자 1명이었다. 제3 내지 제5 및 제6 내지 제8의 피험체에는 7일 이후에 (하위 그룹들 사이에 최소 24시간 간격으로) 투약되었다. 동일한 하위 그룹에서는 각각의 피험체에 적어도 1시간 간격으로 투약되었다. 필요한 경우, 나머지 피험체에 대한 투약은 이러한 집단 내에 제 1 또는 제 2 하위 그룹에 대해 투여 후 기간 동안에 발생하였을 수 있는 어떠한 유의한 안전성 문제에 대해서 검토가 있을 때까지 연기되었다. 상기 이전 집단에 대한 투약 후, 적어도 3주 후에 후속 집단에는 투약하였다.

[0062] 선별 기간: 활성 치료 기간의 시작 이전 최대 21일째 날에 선별 방문(방문 1)이 발생하였다. 사전 동의서 (informed consent)를 제공한 후, 피험체는 적법성을 위해 선별 과정에 참가하였다.

[0063] 치료 기관: -1일째 날(2회차 방문)에 임상 시험 시설[Clinical Pharmacology Unit; CPU)]에 입원하였으며, 최소 10시간의 야간 단식 이후에 1일째 날에 무작위 치료 기간이 시작되었다. 피험체는 단일 투여로서 CD24Fc 또는 플라시보를 이용한 치료에 무작위로 배정되었다. 피험체는 4일째 날 오전까지 외출이 제한되었다.

[0064] 추적 조사: 모든 피험체는 추적 조사 방문(방문 3, 방문 4, 방문 5, 방문 6 및 방문 7)을 위해 7일째, 14일째, 21일째, 28일째 및 42일째(\pm 1일째) 날에 CPU에 다시 내원하였다. 7회차 방문은 모든 피험체에 있어서 최종 방문이었다.

치료 기간:

[0066] 각 피험체에 대한 총 연구 기간은 최대 63일이었다.

[0067] 단일 투여량 투여는 1일째 날에 발생하였다.

피험체수:

[0069] 계획: 40명의 피험체

[0070] 선별: 224명의 피험체

[0071] 무작위화: 40명의 피험체

[0072] 완료: 39명의 피험체

[0073] 중단: 1명의 피험체

[0074] 진단 및 주요 포함 기준: 본 연구를 위한 피험체군은 18kg/m² 내지 30kg/m² (지정 값 포함) 사이의 체질량 지수를 갖는, 18세 내지 55세(지정 값 포함) 사이의 건강한 남성 및 여성이었다.

[0075] 임상시험용 의약품(investigational product) 및 비교측정기 정보(comparator information): CD24Fc: 10mg, 30 mg, 60mg, 120mg 또는 240mg의 단일 투여량이 IV 주입을 통해 투여됨; 제품 번호: 09MM-036. CD24Fc는 인간 CD24의 세포외 도메인 및 인간 면역글로불린 G1(IgG1Fc)의 단편 결정화 영역(fragment crystallizable region)으로 이루어진 완전 인간화 융합 단백질이다. CD24Fc는 IV 투여를 위한 수용액으로서 제공되었으며, 이때 상기 수용액은 멸균되고, 투명하고, 무색이며, 방부제가 없다. CD24Fc는 10mg/ml의 농도 및 pH 7.2의 단일 투여량 주사 용액으로서 제형화되었다. 각각의 CD24Fc 바이얼(vial)에는 16ml \pm 0.2ml의 CD24Fc 중에 160mg의 CD24Fc, 5.3mg의 염화나트륨, 32.6mg의 인산나트륨 7수화물 및 140mg의 제일인산나트륨 1수화물이 함유되어 있다. CD24Fc는 클로로부틸 고무마개 및 알루미늄 플립-오프 밀봉제(flip-off seal)가 구비된 투명한 봉규산 유리 바이얼 내에 제공되었다.

[0076] IV 주입을 통해 투여된 매칭 플라시보(0.9% 염화나트륨, 식염수); 제품 번호: P296855, P311852, P300715 및 P315952.

[0077] 치료 목적(intent-to-treat; ITT) 피험체군은 적어도 1회 투여량의 연구 약물을 투여받았던 모든 피험체로 이루

어져 있다. 상기 ITT 피험체군은 피험체 정보 및 안전성 평가를 위한 1차 분석 피험체군이었다.

[0078] 혈장 시료는 투여 1일 전, 투약일 및 2일째, 3일째, 4일째, 7일째, 14일째, 21(± 1)일째, 28(± 1)일째 및 42(± 1)일째 날에 수집하였다.

[0079] 인용된 참고문헌: Rodriguez AJ, Mastronardi CA, Paz-Filho GJ. New advances in the treatment of generalized lipodystrophy: role of metreleptin. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2015;11:1391-1400. doi:10.2147/TCRM.S66521.

도면

도면1a

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**
NPTNATTKPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISR
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEEQQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

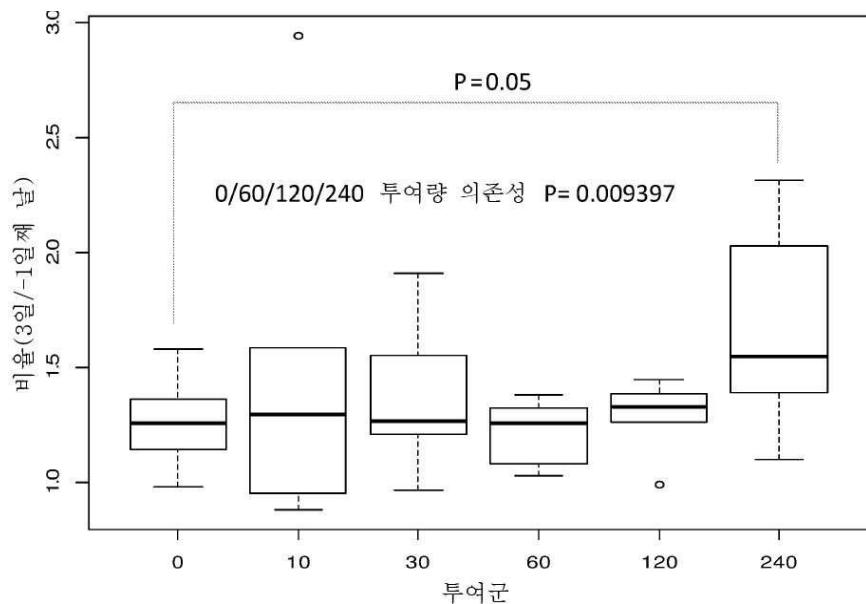
도면1b

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**
NPTNATTKVPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEEQQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면1c

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**
NPTNATTKA~~P~~KSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEEQQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OncoImmune, Inc.

Liu, Yang

Zheng, Pan

Devenport, Martin

<120> USE OF CD24 PROTEINS FOR TREATING LEPTIN-DEFICIENT CONDITIONS

<130> 060275.0501.00PC00

<150> 62290202

<151> 2016-02-02

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222> (31)...(31)

<223> Valine or Alanine

<400> 1

Ser Glu 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> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Glu 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

> 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 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

<220><223> Fusion protein

<400> 5

Met	Gly	Arg	Ala	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu
1													

5

10

15

Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Gln	Ile	Tyr	Ser	Ser	Glu	Thr	Thr	Gly
20														

25

30

Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Gln	Ser	Thr	Ser	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Pro
35															

35

40

45

Asn	Pro	Thr	Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
50															

50

55

60

Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
65															

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
85															

85

90

95

Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
100															

100

105

110

Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
115															

115

120

125

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
130															

130

135

140

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
145															

Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
165															

165

170

175

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
180															

180

185

190

Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
195															

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> 261		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Fusion protein		
<400> 6		
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 Pro Lys		
20	25	30
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
35	40	45
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
50	55	60
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
65 70 75 80		
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
85	90	95
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
100	105	110
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
115	120	125

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

130	135	140
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
145	150	155
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
165	170	175
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
180	185	190
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
195	200	205
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
210	215	220
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
225	230	235
240		
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
245	250	255
Leu Ser Pro Gly Lys		
260		
<210		
> 7		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 7		
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
 <210> 8
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Fusion protein
 <400> 8
 Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg 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 Val Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 50 55 60
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

 65 70 75 80
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 85 90 95
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 100 105 110
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 115 120 125
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

 130 135 140
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr
 145 150 155 160
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 165 170 175
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 180 185 190
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

 195 200 205
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 210 215 220
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 225 230 235 240
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 245 250 255
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

 260 265 270
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

275	280	285
<210> 9		
<211> 288		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Fusion protein		
<400> 9		
Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu		
1	5	10
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 Ala Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
50	55	60
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
65	70	75
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
85	90	95
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
100	105	110
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
115	120	125
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
130	135	140
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
145	150	155
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
160		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
165	170	175
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
180	185	190
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		

195 200 205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

210 215 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

260 265 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

275 280 285

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 10

Thr Val Thr Thr Ser Ala Pro Leu Ser Ser Asn Ser Pro Gln Asn Thr

1 5 10 15

Ser Thr Thr Pro Asn Pro Ala Asn Thr Thr Thr Lys Ala

20 25

<210> 11

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Fusion protein

<400> 11

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 Val Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

50 55 60

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

65 70 75 80

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

260

<210> 12

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

><223> Fusion protein

<400> 12

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 Ala Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

50 55 60

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

65 70 75 80

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

260