



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0034957
(43) 공개일자 2020년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70596 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7036774
(22) 출원일자(국제) 2018년05월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/032699
(87) 국제공개번호 WO 2018/213266
국제공개일자 2018년11월22일
(30) 우선권주장
62/506,135 2017년05월15일 미국(US)
62/506,135 2017년05월15일 미국(US)

(71) 출원인
온코이퓨, 아이앤씨.
미국, 메릴랜드 20850, 록빌, 스위트 113, 키 웨
스트 애비뉴 9430
칠드런스 내셔널 메디컬 센터
미국 워싱턴주 20010 노스웨스트 미시건 애비뉴
111
(72) 발명자
리우, 양
미국, 20002 워싱턴 D.C., 워싱턴, 502 E 스트리
트 NE
쥬, 판
미국, 20002 워싱턴 D.C., 워싱턴, 502 E 스트리
트 NE
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신관호

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 신경 보호 및 재수초화를 위한 가용성 CD24의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 희돌기교세포를 보호 및 유지하는 방법 및 탈수초성 장애를 치료하는 방법에서의 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

리, 님

미국, 13850-2873 뉴욕, 베스탈, 아파트 17, 3127
브리스 로드

데븐포트, 마틴

미국, 20878 메릴랜드, 게이더스버그, 614 스틸 크
리크 레인

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 탈수초성 장애를 치료하는데 사용하기 위한 CD24 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탈수초성 장애가 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 다발성 경화증, 급성 전파 뇌척수염, 신경근염 광섬유종 장애, 시신경염, 횡단 골수염 및 급성 이완성 골수염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, CD24 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 회돌기교세포를 유지하는, CD24 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 회돌기교세포의 전환을 촉진하는 다른 약제가 대상체에 투여되는, CD24 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 회돌기교세포에 의해 미엘린 생산을 촉진하는 다른 약제가 대상체에 투여되는, CD24 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 성숙한 인간 CD24 또는 그의 변이체를 포함하는, CD24 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 성숙한 인간 CD24가 서열 번호 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, CD24 단백질.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 단백질 태그를 추가로 포함하고, 단백질 태그가 CD24 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된, CD24 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단백질 태그가 포유류 면역 글로불린 (Ig) 단백질의 일부를 포함하는, CD24 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 Ig 부분이 인간 Ig 단백질의 Fc 영역인, CD24 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Fc 영역이 인간 Ig 단백질의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인을 포함하고, Ig가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgA로 이루어진 군으로부터 선택되는, CD24 단백질.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 Fc 영역이 힌지 영역 및 IgM의 CH2, CH3 및 CH4 도메인을 포함하는, CD24 단백질.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 서열 번호 6, 11 또는 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, CD24 단백질.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 가용성인, CD24 단백질.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 글리코실화되는, CD24 단백질.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 CD24 단백질이 진핵 세포의 단백질 발현 시스템을 사용하여 제조되는, CD24 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 발현 시스템이 중국 햄스터 난소 세포주에 포함된 벡터 또는 복제 결함 레트로바이러스 벡터를 포함하는, CD24 단백질.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 복제-결함 레트로바이러스 벡터가 진핵 세포의 게놈에 안정적으로 통합된, CD24 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 회돌기교세포를 보호 및 유지하는 방법 및 탈수초성 장애를 치료하는 방법에서의 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수초는 축삭 주위를 감싸고 이를 따라 축삭 신호 전도를 매개하고 영양 지원을 제공하는 층상의, 지질이 풍부한 구조이다. 중추 신경계 (CNS)에서, 수초는 회돌기교세포에 의해 형성된다. 미엘린은 다발성 경화증 (MS)과 같은 신경 면역 장애(disorder)를 포함하는 탈수초성 질환(disease)의 표적이다. 재수초화는 회돌기교세포 전구체 세포 (OPC)를 동축시켜 회돌기교세포를 형성하는 과정이며, 세포는 중추 신경계 (CNS)에서 탈수초화된 축삭에 새로운 수초를 생성할 수 있다. 미엘린 변성에 반응하여, 회돌기교세포 간세포 (OPC)라는 다분화능 조직실질 간세포가 활성화되고 손상된 부위로 모집된다. 이는 신체에서 자연적으로 조절되는 과정이며 건강한 CNS에서 매우 효율적인 경향이 있다. 그러나 신경-면역 장애를 가진 사람들의 경우, 재수초화가 점점 불완전해져서 축삭이 영구적으로 탈수초화되고 퇴화에 취약하게 되며, 많은 환자들에서 결국에는 더 진행성의 질환 형태로 이어진다.

[0003] MS와 같은 질환에서 재수초화 실패의 이유는 아직 완전히 이해되지 않았으며 복잡할 것으로 예상된다. 여러 연구에 따르면 만성 탈수초화 MS 병변의 일부에는 재수초화 회돌기교세포로 차별화되지 않는 OPC가 포함되어 있다. 회돌기교세포는 재수초화 의존적 및 독립적인 메커니즘 모두에 의해 신경 보호에 중요한 역할을 하고 MS, 알츠하이머 병 및 잠재적으로 파킨슨 병을 포함하는 중추 신경계 관련 염증 및 퇴행성 질환 모두에 보호를 부여한다(1-4).

[0004] 따라서, 회돌기교세포의 보호 및 유지를 촉진하고 수초화 활동을 촉진하여 탈수초화 장애에 대한 치료에 대한 충족되지 않은 의학적 요구가 크다.

발명의 내용

[0005] 회돌기교세포 유지, 골수화 촉진 및 중추 신경계를 수반하는 염증성 및 퇴행성 질환을 포함하는 탈수초성 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다. 방법은 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 탈수초성 장애는 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 다발성 경화증, 급성 전과 뇌척수염, 신경근염 광섬유증 장애, 시신경염, 횡단 골수염 또는 급성 이완성 골수염일 수 있다. CD24 단백질은 회돌기교세포를 유지할 수 있다. 상기 방법은 회돌기교세포의 전환을 촉진하거나 회돌기교세포에 의한 미엘린 생산을 촉진하는 다른 약제를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0006] CD24 단백질은 성숙한 인간 CD24 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 성숙한 인간 CD24는 서열 번호 1 또는 2

에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. CD24 단백질은 인간 CD24의 세포 외 도메인 중 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. CD24 단백질의 서열은 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있는 CD24의 신호 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 신호 펩티드 서열은 단백질을 발현하는 세포로부터의 분비를 허용할 수 있다. 신호 펩티드 서열은 또한 다른 막 횡단 또는 분비 단백질에서 발견되는 것, 또는 당업계에 공지된 기존의 신호 펩티드로부터 변형된 것일 수 있다. CD24 단백질은 가용성일 수 있다. CD24 단백질은 글리코실화될 수 있다. CD24 단백질은 진핵 생물 단백질 발현 시스템을 사용하여 생산될 수 있으며, 이는 중국 햄스터 난소 세포주에 함유된 벡터 또는 복제 결합 레트로바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 복제 결합 레트로바이러스 벡터는 진핵 세포의 게놈에 안정적으로 통합될 수 있다.

[0007]

CD24 단백질은 CD24 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있는 단백질 태그를 포함할 수 있다. 단백질은 포유류 면역 글로불린 (Ig)의 일부를 포함할 수 있으며, 이는 인간 Ig 단백질의 Fc 영역일 수 있다. 인간 Ig 단백질은 인간 Ig 단백질의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있고, 인간 Ig 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA 일 수 있다. Fc 영역은 또한 힌지 영역 및 IgM의 CH2, CH3 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. CD24 단백질은 서열 번호 5, 6, 8, 9, 11 또는 12에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008]

도 1a는 전장 CD24 융합 단백질, CD24Fc (본원에서 CD24Ig로도 지칭됨) (서열 번호 5)의 아미노산 조성을 도시한다. 밀줄친 26 개 아미노산은 CD24의 신호 펩티드 (서열 번호 4)이며, 이는 단백질을 발현하는 세포로부터 분비하는 동안 절단되어 단백질의 가공된 버전 (서열 번호 6)에서 누락된다. 서열의 굵은 체 부분은 융합 단백질 (서열 번호 2)에 사용된 성숙한 CD24 단백질의 세포 외 도메인이다. 성숙한 CD24 단백질에 통상적으로 존재하는 마지막 아미노산 (A 또는 V)은 면역 원성을 피하기 위해 작제물로부터 삭제되었다. 밀줄이 없는, 굵지 않은 글자는 힌지 영역 및 CH1 및 CH2 도메인 (서열 번호 7)을 포함하는 IgG1 Fc의 서열이다. 도 1b는 성숙한 인간 CD24 단백질 (굵은 체)이 서열 번호 1의 발린 다형성 변이체 인 CD24^VFc (서열 번호 8)의 서열을 보여준다. 도 1c는 성숙한 인간 CD24 단백질 (굵은 체)이 서열 번호 1의 알라닌 다형성 변이체인 CD24^AFc (서열 번호 9)의 서열을 보여준다. 도 1b 및 1c에서의 융합 단백질의 다양한 부분은 도 1a에서와 같이 표시되어 있고, 변이체 발린/알라닌 아미노산은 이중 밀줄로 표시되어 있다.

도 2는 마우스 (서열 번호 3) 및 인간 (서열 번호 1)으로부터의 성숙한 CD24 단백질 사이의 아미노산 서열 변이를 보여준다. 잠재적인 O-글리코실화 부위는 굵게 표시되고, N-글리코실화 부위는 밀줄이 그어져 있다.

도 3. CD24IgG1 (CD24Fc)의 약동학의 윈논린(WinNonlin) 구획 모델링 분석. 열린 원은 3 마리의 마우스의 평균을 나타내고, 선은 예측된 약동학적 곡선이다. 도 3a. 1 mg CD24IgG1의 정맥내 주사. 도 3b. 1 mg CD24IgG1 (CD24Fc)의 피하 주사. 도 3c. 곡선 하 면적 (AUC), 반감기 및 최대 혈중 농도에 의해 측정된 혈중 항체의 총량의 비교. 피하 주사의 AUC 및 Cmax는 전체적으로 정맥내 주사의 약 80%이지만 차이는 통계적으로 유의하지는 않는다.

도 4. CD24-시글렉 G (10) 상호 작용은 PAMP와 DAMP를 구별한다. 도 4a. PAMP에 대한 호스트 응답은 CD24-시글렉 G (10) 상호 작용에 의해 영향을 받지 않았다. 도 4b. CD24-시글렉 G (10) 상호 작용은 가능하면 시글렉 G/10 관련 SHP-1을 통해 DAMP에 대한 호스트 응답을 억제한다.

도 5. 시험관내 CD24Fc와 미엘린 관련 당단백질 (MAG)의 결합

도 6. 마우스 EAE.C57BL/6j 마우스에서 인간 CD24 융합 단백질의 치료 효능은 도 4의 범례에 기재된 바와 같이 MOG 펩티드로 면역화시켰다. 면역화 후 14 내지 21 일에, 2.5 내지 3.5의 EAE 점수에 도달한 마우스를 임의로 3 개의 그룹으로 나누고 격일로 CD24 융합 단백질 (200 또는 50 μ g/주사) 또는 대조군 단백질 (200 μ g/주사)의 5 회 주사로 처리하였다. 제시된 데이터는 임상 점수의 평균 및 SE이다. * P<0.05, ** P<0.01. 전체적으로, 200 μ g의 융합 단백질이 투여될 때 유의한 치료 효과가 관찰되었다 (P=0.0083). 치료 효과는 그룹 당 총 7 내지 12 마리의 마우스로 2 회의 독립적인 실험에서 관찰되었다.

도 7. CD24Fc는 MOG-프라이밍된 T 세포에 의한 자가 면역 파괴를 방지한다. 6 주령 암컷 C57BL/6 마우스를 0 일에 CFA에서 MOG 펩티드로 면역화시켰다. 면역화 후 7 일째에, 대다수의 마우스에서 임상 증상이 없었을 때, 마우스를 격일로 복강 내 (200 μ g/주사/마우스) 대조군 인간 IgG Fc 또는 CD24Fc로 처리하여 화살표로 표시된 바와 같이, 총 5 회 주사하였다. 임상 증상에 대해 점수를 얻기 위해 마우스를 매일 검사하였다. 나타난 데이터는 그룹 당 9 및 10 마리 마우스를 갖는 평균 및 SEM이다. (P=0.0019, 피셔의 PLSD 테스트). 치료 효과는 다

른 실험에서 재현되었다.

도 8. 마우스에서 CD24Fc의 최소 유효 용량의 확인. C57BL/6 마우스를 MOG로 면역시키고 도 4의 범례에 상세히 기술된 바와 같이 CD24Fc로 처리하였다. CD24Fc에 의해 유발된 역제의 %를 계산하기 위해 첫 달 동안 누적 질환 점수를 사용하였다. IgG1Fc-처리 군의 점수를 기준선으로 사용하였다. 로그 곡선 맞춤을 사용하여 최소 유효 용량을 계산했다.

도 9. SJL 모델에서 재발성 배출 EAE의 CD24Fc 처리. 6 주령 암컷 SJL 마우스를 0 일에 CFA에서 PLP 펩티드로 면역화시켰다. 면역화 후 7 일에, 대다수의 마우스에서 임상 증상이 없을 때, 마우스를 격일로 복강 내 (200 μ g/주사/마우스) 대조군 인간 IgG Fc 또는 CD24 Ig로 처리하여 총 5 회 주사 (7, 9, 11, 13 및 15 일)하였다. 임상 증상에 대해 점수를 얻기 위해 마우스를 매일 검사하였다. 나타난 데이터는 각 그룹에서 14 또는 15 마리 마우스를 사용한 평균 및 SEM이다. $P=0.0039$, 피셔의 PLSD 테스트. SJL 모델의 치료 효과가 3 번 반복되었다. IgG1Fc가 이 모델을 포함하는 일부 실험에서 질병 점수를 악화시키고 (따라서 치료 효과가 팽창됨), GMP 등급 비히클 (PBS)이 이 모델에서 사용되었다.

도 10. 나이브 및 EAE 마우스의 CNS에서 CD24Fc의 농도. EAE는 8 내지 10 주 암컷 C57BL/6 마우스에 400 μ g의 결핵균을 함유하는 완전 프로인드 보강제 (CFA)에서 200 μ g MOG35-55 펩타이드로 피하 면역에 의해 유도되었다. 면역화 후 48 시간 후에 즉시 200ng의 백일해 독소를 정맥내 주사하였다. EAE 유도 후 11 일에, 마우스에 1mg CD24Fc를 정맥 내 투여하였다. 연령-일치된 나이브 암컷 C57BL/6 마우스는 또한 동일한 양의 CD24Fc를 정맥 내로 받았다. 24 시간 후, 뇌척수액 (CSF)을 두 그룹의 마우스로부터 수확하고, 샌드위치 ELISA에 의해 CNS의 CD24Fc 농도를 측정하였다. 이 연구에서, PBS로 투여된 나이브 마우스로부터의 뇌척수액을 음성 대조군으로 사용하였다.

도 11. Cd24 또는 시글렉g의 표적화된 돌연변이는 회돌기교세포의 쿠프리존 (CPZ) 치료에 대한 감수성을 증가시킨다. 도 11a. 뇌량 조직 절편의 위치를 분석했다. 도 11b. WT, Cd24-/-및 시글렉g-/-마우스의 브레그마-1 뇌 영역에서 올리고-2 염색의 대표적인 이미지. 8 주령에, 마우스에게 회생 전에 2 내지 5 주 동안 0.2 중량%의 CPZ를 함유하는 음식을 공급하였다. 추가 동물을 CPZ-함유 식이에 5 주 동안 유지한 다음, 회생 전에 추가 10 일 동안 회복 (식이로부터 CPZ의 제거)하도록 하였다. 대조군은 정상 음식으로 유지되었다. 마우스에 인산 완충 식염수 (PBS)를 심근 관류하고 PBS 중 차가운 4% 파라포름알데히드를 주입하였다. 뇌를 제거하고, 4% 파라포름알데히드에서 밤새 고정시키고, 동결 보호 용액으로 옮겼다. 두부 냉동 절편 (30 μ m, 자유 부유)을 Leica 슬라이딩 마이크로톰에서 절단했다. 부유 절편을 PBS에서 행구고 실온에서 1 시간 동안 5% 정상 당나귀 또는 염소 혈청으로 차단하였다. 이어서, 절편을 항-올리고 2 항체 (EMD Millipore, 카탈로그 번호 Ab9610, 1:2000 희석에서 사용됨)와 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하고, 이어서 실온에서 플루오로 555-접합된 당나귀 항-토끼 IgG 2 차 항체 (Invitrogen, 카탈로그 번호 A-31572)와 1 시간 배양하였다. 이어서, 절편을 세척하고, DAPI로 염색하고, 유리 슬라이드에 장착하고, Fluoromount-G로 커버를 덮었다. 도 11c. WT, Cd24-/-및 시글렉g-/-뇌의 브레그마-1 영역에서 회돌기교세포의 수에 CPZ에 미치는 영향에 대한 요약 데이터. 제시된 데이터는 두 개의 독립적인 실험을 나타낸다. 스튜던트 t-검정을 사용하여 P 값을 결정하였다. 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시된다. 도 11d. CD24Fc의 단일 전신 투여 후 CSF 및 혈청에서 CD24Fc 농도가 검출되었다 (10mg/마우스). 이 데이터는 두 개의 분리된 실험, N=4를 나타낸다. 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시된다. 도 11e. 치료 실험을 위한 연구 시간표. 도 11f. 단일 용량의 CD24Fc 처리(10mg/마우스) 후 2 또는 4 주에 브레그마-1에서 올리고 2+ 세포의 수. 제시된 데이터는 두 개의 독립적인 실험을 나타낸다. P 값은 스튜던트 t-검정에 의해 결정되었다. N = 4. 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시된다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시된다.

도 12는 인간 대상체에서 PK 평가 가능한 집단에 대한 처리에 의한 평균 혈장 CD24Fc 농도($\pm$ SD)의 플롯을 보여준다. PK = 약동학; SD = 표준 편차.

도 13은 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc C_{max} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

도 14는 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc AUC_{0-42d} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

도 15는 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc AUC_{0-inf} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 본 발명자들은 놀랍게도, CD24의 가용성 형태가 회소돌기교세포를 유지하고 탈수초화와 관련된 신경 면역 장애의 치료에 매우 효과가 있음을 발견했다. 이 효과는 손상 관련 분자 패턴을 통해 매개될 수 있다. 패턴 인식은 각각 PAMP 및 DAMP로 불리는 병원체 관련 및 조직 손상 관련 분자 패턴에 의해 유발되는 염증 반응에 관여한다. 이론에 구속되지 않으면서, DAMP에 대한 약화된 숙주 반응은 염증성 및 자가 면역 질환의 발병에서 일부 역할을 할 수 있다. DAMP는 동물 모델에서 염증성 사이토카인의 생성 및 자가 면역 질환을 촉진하는 것으로 밝혀졌으며, 결과적으로 HMGB1 및 HSP90과 같은 DAMP 억제제는 류마티스 관절염(RA)을 개선시키는 것으로 밝혀졌다(4-6). TLR, RAGE-R, DNGR (Clec9A에 의해 암호화됨) 및 민클(Mincle)은 다양한 DAMP에 의해 개시되는 염증을 매개하는 수용체인 것으로 밝혀졌다(2, 7-14).
- [0010] 본 발명자들은 CD24-시글렉 G 상호 작용이 PAMP로부터 DAMP에 대한 선천성 면역을 식별한다는 것을 입증하였다(15, 16). 시글렉(Siglec) 단백질은 다양한 시알산 함유 구조를 인식하는 막 관련 면역 글로불린(Ig) 수퍼 패밀리에 속한다. 대부분의 시글렉에는 SHP-1, -2 및 Cbl-b와 연관되어 염증 반응의 주요 조절자를 제어하는 세포 내 면역 티로신 억제 모티프(ITIM)가 있다. CD24는 마우스의 시글렉, 시글렉 G 및 인간의 시글렉 10에 대한 첫 번째 천연 리간드로 확인되었다(15). 시글렉 G는 SHP-2분의 1 신호전달 메커니즘을 통해 HMGB1과 같은 DAMP에 대한 TLR 매개 숙주 반응을 억제하는 시알릴화 CD24와 상호 작용하고(15), 이는 SLE 병인에 관해 중요하다(2). 시글렉 G는 Cbl과 결합하여 RIG-I의 분해를 유발하여 인간 루푸스 발병 기전의 주요 인자인 I형 인터페론 반응의 억제를 유발한다(17).
- [0011] 또한, 본 발명자들은 CD24가 조직 또는 기관 손상의 결과로서 방출되는 세포 성 DAMP에 대한 숙주 반응을 음성으로 조절하고, 적어도 2개의 중첩 메커니즘이 이러한 활성을 설명할 수 있음을 입증하였다. 먼저, CD24는 HSP70, HSP90, HMGB1 및 뉴클레오린을 포함한 여러 DAMP에 결합하여 이러한 DAMP에 대한 숙주 반응을 억제한다. 이를 위해, CD24는 염증 자극을 포획하여 그들의 수용체, TLR 또는 RAGE와의 상호 작용을 방지할 수 있다고 추정된다. 둘째, 그의 수용체 시글렉 G와의 상호 작용을 통해 CD24는 조직 손상에 대한 숙주 반응에 대한 강력한 음성 조절을 제공한다. 이 활성을 달성하기 위해, CD24는 시글렉 G에 의한 신호 전달에 결합하고 시글렉 G-연관 SHP1이 음성 조절을 유발할 수 있다. 어느 유전자의 표적화된 돌연변이를 갖는 마우스가 훨씬 더 강한 염증 반응을 갖는 마우스처럼, 두 기작 모두가 함께 작용할 수 있다. 실제로, CD24^{-/-} 또는 시글렉 G^{-/-} 마우스의 골수로부터 배양된 DC는 HMGB1, HSP70 또는 HSP90으로 자극될 때 더 높은 수준의 염증성 사이토카인을 생산하였다. CD24는, 본 발명자들의 지식에 따르면, DAMP에 의해 유발된 염증을 차단할 수 있는 유일한 억제성 DAMP 수용체이며, 현재 조직 손상에 대한 숙주 염증 반응을 특이적으로 표적화하는 약물은 존재하지 않는다. 또한, 외인성 가용성 CD24 단백질은 류마티스 관절염, 다발성 경화증 및 이식편대숙주병의 마우스 모델에서 DAMP-매개 자가 면역 질환을 완화시킨다.
- [0012] 인간 CD24는 CD24 유전자에서 240개 염기쌍의 오픈 리딩 프레임에 의해 암호화된 작은 GPI 고정 분자이다(28). 80개 아미노산 중, 처음 26개는 신호 펩티드를 구성하고, 마지막 23개는 GPI 꼬리의 부착을 허용하기 위해 절단을 위한 신호로서 작용한다. 결과적으로, 성숙한 인간 CD24 분자는 단지 31개의 아미노산을 갖는다. 31개 아미노산 중 하나는 인간 집단에서 다형성이다. 오픈-리딩 프레임의 뉴클레오타이드 170에서 C에서 T로의 전이는 알라닌(A)을 발린(V)으로 치환시킨다. 이 잔기가 절단 부위에 대한 즉각적인 N-말단에 있고, 교체가 비보존적이기 때문에, 이들 2개의 대립 유전자는 세포 표면에서 상이한 효율로 발현될 수 있다. 실제로, cDNA에 의한 형질 감염 연구는 CD24^{V/V} 대립 유전자가 세포 표면에서 보다 효율적으로 발현되는 것으로 입증되었다(28). 이에 따라, CD24^{V/V} PBL은 특히 T 세포에서 더 높은 수준의 CD24를 발현시켰다.
- [0013] 본 발명자들은 DAMP에 대한 선천적 염증 반응을 선택적으로 조절하는 축을 형성하는 Cd24 또는 시글렉g의 표적화된 돌연변이가 쿠프리존-유도된 회돌기교세포 손실로부터 마우스를 보호한다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 시글렉 G 신호 전달을 자극하고 생체 내 염증 반응을 억제하는 것으로 공지된 CD24 단백질(CD24Fc)의 전신 투여가 쿠프리존에 대한 만성 노출에 대해 회돌기교세포를 보호한다는 것을 추가로 발견했다. 따라서, 세포 손상에 대한 숙주 반응은 회돌기교세포 손실에 적극적으로 참여하고, 병리학적 조건 하에서 회돌기교세포를 유지하기 위한 새로운 접근법을 제공한다.
- [0014] 따라서, 본원에 기술된 방법은 중추 신경계와 관련된 염증성 및 퇴행성 질환을 완화, 최소화 또는 치료하기 위해 신경 보호를 제공하는데 사용될 수 있다. 특히, 본원에 기술된 방법은 다발성 경화증(MS), 급성 전파 뇌척수염(ADEM), 신경근염 광섬유종 장애(NMOSD), 시신경염(ON) 및 급성 이완성 골수염(AFM)일 수 있는, 골수염(TM)을 포함하는 신경 면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

- [0015] **1.정의**
- [0016] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예만을 설명하기 위한 것이며 제한하고자하는 것은 아니다. 본원 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "an", "a" 및 "the"는 문맥상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다.
- [0017] 본 명세서에서 수치 범위의 인용을 위해, 동일한 정도의 정밀도를 갖는 그 사이의 각각의 개재 번호가 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6 내지 9 범위의 경우, 6 및 9 외에 7과 8의 숫자가, 6.0 내지 7.0의 경우 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0이 명시적으로 고려된다.
- [0018] "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결된 서열이며, 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.
- [0019] "실질적으로 동일한"은 제 1 및 제 2 아미노산 서열이 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 또는 300 아미노산의 영역에서 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인 것을 의미할 수 있다.
- [0020] 질환으로부터 동물의 보호를 언급할 때 "치료(Treatment)" 또는 "치료하는(treating)"은 질병을 예방, 억제, 억제 또는 완전히 제거하는 것을 의미한다. 질환을 예방하는 것은 질환의 발병 전에 동물에 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억제하는 것은 본 발명의 조성물을 질환의 유도 후 및 임상 출현 전에 동물에 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억제하는 것은 본 발명의 조성물을 질환의 임상적 출현 후 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0021] "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미할 수 있다. "생물학적 활성"의 대표적인 예는 킬-유사 수용체에 결합하고 특정 항체에 의해 결합되는 능력을 포함한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 참조된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 아미노산을 유사한 특성 (예를 들어, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 대체하는 것은 당업계에서 전형적으로 작은 변화를 수반하는 것으로 인식된다. 이러한 사소한 변화는 당업계에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 수치 지수를 고려함으로써 부분적으로 확인될 수 있다. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). 아미노산의 수치 지수는 이의 소수성 및 전하의 고려에 기초한다. 유사한 수치 지수의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 유지할 수 있다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 일 측면에서, 수치 지수가 ± 2 인 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 초래하는 치환을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 펩티드와 관련하여 아미노산의 친수성을 고려하면, 펩티드의 가장 큰 국소 평균 친수성을 계산할 수 있는데, 이는 항원성 및 면역원성과 관련이 있는 것으로 보고된 유용한 척도이다. 미국 특허 제 4,554,101 호는 본원에 참조로 완전히 포함된다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 보유하는 펩티드를 초래할 수 있다. 치환은 서로 ± 2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값 둘 다는 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향을 받는다. 이러한 관찰과 일치하게, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 밝혀진 바와 같이 아미노산의 상대적 유사성, 특히 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다.
- [0022] **2. CD24**
- [0023] 성숙한 CD24 또는 그의 변이체를 포함할 수 있는 CD24 단백질이 본원에 제공된다. 성숙한 CD24는 CD24의 세포 외 도메인 (ECD)에 해당한다. 성숙한 CD24는 인간 또는 다른 포유류로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 기술한 바와 같이, 성숙한 인간 CD24 단백질은 31 개 아미노산 길이이고, 그의 C-말단에 가변 알라닌(A) 또는 발린(V) 잔기를 갖는다:
- [0024] SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK(V/A) (서열 번호 1)
- [0025] C-말단 발린 또는 알라닌은 면역원성일 수 있고 CD24 단백질에서 생략될 수 있으며, 이는 면역원성을 감소시킬 수 있다. 따라서, CD24 단백질은 C-말단 아미노산이 결여된 인간 CD24의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
- [0026] SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK (서열 번호 2)

[0027] 마우스 및 인간으로부터의 성숙 CD24 단백질의 아미노산 서열에서 상당한 서열 변이에도 불구하고, 인간 CD24Fc가 마우스에서 활성인 것으로 나타난 바와 같이, 이들은 기능적으로 동등하다. 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열은 마우스 단백질 (39% 동일성; Genbank 수탁 번호 NP_033976)에 의한 일부 서열 보존을 나타낸다. 그러나 CD24 ECD가 종에 따라 길이가 27 내지 31 개 아미노산이고 시글렉 10/G와 같은 일부 수용체(들)에 대한 결합이 당 단백질의 시알산 및/또는 갈락토스 당에 의해 매개되기 때문에 동일성 백분율이 높지 않다는 것은 놀라운 일이 아니다. 인간 시글렉-10의 세포 외 도메인 (GenBank 수탁 번호 AF310233)과 그의 뮤린 상동체 시글렉-G (GenBank 수탁 번호 NP_766488) 수용체 단백질 사이의 아미노산 서열 동일성은 63%이다 (도 2). 주로 C-말단 및 글리코실화 부위가 풍부한 곳에서의 마우스와 인간 CD24 사이의 서열 보존의 결과로서, 특히 이러한 변이가 C-말단의 보존된 잔기에 영향을 미치지 않거나 마우스 또는 인간 CD24로부터의 글리코실화 부위에 영향을 미치지 않는 경우, 성숙한 CD24 단백질의 상당한 변이가 CD24 단백질을 사용하여 견딜 수 있다. 따라서, CD24 단백질은 성숙한 쥐 CD24의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

[0028] NQTSVAPFPNGNQNISASPNPTNATTRG (서열 번호 3)

[0029] 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열은 마우스보다 시노물구스 원숭이 단백질 (52% 동일성; UniProt 수탁 번호 UniProtKB-I7GKK1)에 의한 더 많은 서열 보존을 나타낸다. 다시 한 번, ECD가 이들 중에서 단지 29 내지 31 개 아미노산 길이이고 그것의 수용체(들)에 결합하는 당 잔기의 역할로 인해 동일성 백분율이 높지 않다는 점은 놀라운 일이 아니다. 시노물구스 시글렉-10 수용체의 아미노산 서열은 결정되지 않았지만, 인간 및 붉은 털 원숭이 원숭이 시글렉-10 (GenBank 수탁 번호 XP_001116352) 단백질 사이의 아미노산 서열 동일성은 89%이다. 따라서, CD24 단백질은 또한 성숙한 시노물구스 (또는 붉은 털) 원숭이 CD24의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

[0030] TVTTSAPLSSNPQNTSTTPNPANTTTKA (서열 번호 10)

[0031] CD24 단백질은 가용성일 수 있다. CD24 단백질은 단백질을 발현하는 세포로부터 분비되도록 N-말단 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 신호 펩티드 서열은 아미노산 서열 MGRAMVARLGLGLLLALLLPTQIYS (서열 번호 4)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 신호 서열은 다른 막 횡단 또는 분비 단백질에서 발견되는 것, 또는 당업계에 공지된 기존 신호 펩티드로부터 변형된 것 중 임의의 것일 수 있다.

[0032] a. 융합

[0033] CD24 단백질은 그의 N- 또는 C-말단에서 단백질 태그에 융합될 수 있으며, 이는 인간 또는 마우스 또는 다른 종일 수 있는 포유류 Ig 단백질의 일부를 포함할 수 있는 단백질 태그이다. 부분은 Ig 단백질의 Fc 영역을 포함할 수 있다. Fc 영역은 Ig 단백질의 힌지 영역, CH2, CH3 및 CH4 도메인 중 하나 이상을 포함할 수 있다. Ig 단백질은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA 일 수 있고, Fc 영역은 힌지 영역, 및 Ig의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. Fc 영역은 인간 면역 글로불린 G1 (IgG1) 동형 서열 번호 7을 포함할 수 있다. Ig 단백질은 또한 IgM 일 수 있고, Fc 영역은 IgM의 힌지 영역 및 CH2, CH3 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. 단백질 태그는 단백질의 정제를 돕는 친화성 태그 및/또는 기능성 단백질의 용해도 및 회수를 향상시키는 용해도 향상 태그일 수 있다. 단백질 태그는 또한 CD24 단백질의 원자가를 증가시킬 수 있다. 단백질 태그는 또한 GST, His, FLAG, Myc, MBP, NusA, 티오레독신 (TRX), 소형 유비퀴틴-유사 개질제 (SUMO), 유비퀴틴 (Ub), 알부민 또는 카멜리드 Ig를 포함할 수 있다. 융합 단백질을 제조하고 융합 단백질을 정제하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0034] 전임상 연구에 기초하여, 실시예에서 확인된 융합 단백질 CD24Fc의 구축을 위해, 즉 GPI 신호 절단 부위 전에 최종 다형성 아미노산이 결여되어 있는, 30 개 아미노산의 절단된 형태의 원시 CD24 분자 (즉, 서열 번호 2를 가지는 성숙한 CD24 단백질)가 사용되었다. 성숙한 인간 CD24 서열은 인간 IgG1 Fc 도메인 (서열 번호 7)에 융합된다. 전장 CD24Fc 융합 단백질은 서열 번호 5에 제공되고 (도 1), 세포로부터 분비된 (즉, 절단된 신호 서열이 없음) CD24Fc 융합 단백질의 가공된 버전은 서열 번호 6에 제공된다. IgG1 Fc에 융합된 성숙 CD24 (즉, 서열 번호 1을 갖는 성숙 CD24 단백질)의 가공된 다형성 변이체는 서열 번호 11 또는 12를 포함할 수 있다.

[0035] b. 생산

[0036] CD24 단백질은 크게 글리코실화될 수 있고, 면역 세포의 공동자극 및 손상 관련 분자 패턴 분자 (DAMP)와의 상호 작용과 같은 CD24의 기능에 관여할 수 있다. CD24 단백질은 진행 생물 발현 시스템을 사용하여 제조될 수 있다. 발현 시스템은 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포와 같은 포유류 세포에서 벡터로부터의 발현을 수반할 수 있다. 시스템은 또한 진행 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있는 복제 결합 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터일 수 있다. CD24 단백질은 또한 세포 계능으로 통합된 벡터 또는 벡터의 일부로부터 CD24 단백질을 발

현하는 안정한 세포주로부터 생산될 수 있다. 안정한 세포주는 통합된 복제 결합 레트로바이러스 벡터로부터 CD24 단백질을 발현할 수 있다. 발현 시스템은 GPEx™일 수 있다.

[0037] **c. 약제학적 조성물**

[0038] CD24 단백질은 약제학적으로 허용되는 양의 CD24 단백질을 포함할 수 있는 약제학적 조성물에 함유될 수 있다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 용매를 포함할 수 있으며, 이는 연장된 기간에 걸쳐 CD24 단백질을 안정하게 유지할 수 있다. 용매는 PBS일 수 있으며, 이는 -20℃ (-15℃ 내지 -25℃)에서 CD24 단백질을 적어도 66 개월 동안 안정하게 유지할 수 있다. 용매는 다른 약물과 조합하여 CD24 단백질을 수용할 수 있다.

[0039] 약제학적 조성물은 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 주사용 제제는 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유제의 형태일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및 분산제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 제제화제를 함유할 수 있다. 조성물은 또한 멸균 무발열 수를 포함하지만 이에 제한되지 않는 적합한 비히클로 재구성하기 위한 분말 형태로 제공될 수 있다.

[0040] 약제학적 조성물은 또한 데포 제제로서 제형화될 수 있으며, 이는 이식 또는 근육 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 조성물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용되는 오일 중의 유제), 이온 교환 수지, 또는 난용성 유도체 (예를 들어 난용성염)로 제형화될 수 있다. 피하 주사용 제제는 루푸스와 같은 적응증 및 이와 관련된 증상 및 합병증에 특히 관련될 수 있다.

[0041] **d. 용량**

[0042] CD24 단백질의 용량은 궁극적으로 허용 가능한 독성 및 임상적 효능을 갖는 용량을 결정하기 위해 임상 시험을 통해 결정될 수 있다. 초기 임상 용량은 설치류 및 비인간 영장류에서의 약동학 및 독성 연구를 통해 추정할 수 있다. CD24 단백질의 용량은 원하는 회돌기교세포 유지 정도 또는 치료되는 신경 면역 장애, 및 투여 경로에 따라, 0.01 mg/kg 내지 1000mg/kg 일 수 있고, 1 내지 500 mg/kg 일 수 있다. CD24 단백질은 정맥 내 주입 또는 피하, 교내 (즉, 공동 또는 기관의 벽 내) 또는 복강 내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 용량은 10 내지 1000 mg, 10 내지 500 mg, 10 내지 240 mg, 10 내지 120 mg, 또는 10, 30, 60, 120 또는 240 mg일 수 있고, 여기서 대상은 인간이다.

[0043] **3. 치료 방법**

[0044] 본 명세서에 기재된 CD24 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 회돌기교세포를 유지하는 방법이 본원에 제공된다. CD24 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 탈수초성 장애일 수 있는 신경-면역 장애를 치료하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. CD24 단백질은 신경 면역 장애 또는 탈수초성 장애가 있거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 회돌기교세포는 회돌기교세포 수초화 활동을 향상시키거나 개선시킴으로써 대상체의 중추 신경계 (CNS)에서 유지될 수 있다.

[0045] CD24 단백질을 이를 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 대상에게 신경 보호를 제공하는 방법이 또한 본원에 제공된다. CD24 단백질은 CNS 내의 세포에 신경 보호를 제공할 수 있다. 신경 보호는 중추 신경계와 관련된 염증성 또는 퇴행성 질환을 완화, 최소화 또는 치료할 수 있다. 염증성 또는 퇴행성 질환은 다발성 경화증, 알츠하이머 병 또는 파킨슨 병일 수 있다.

[0046] 신경 면역 질환은 MS, 급성 전파 뇌척수염 (ADEM), 신경근염 광섬유종 장애 (NMOSD), 시신경염 (ON) 또는 급성 이완성 척수염 (AFM) 일 수 있는, 횡단 척수염 (TM)일 수 있다. CD24 단백질은 또한 신경 면역 장애를 완화, 감소 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0047] **a. 투여**

[0048] 약제학적 조성물의 투여 경로는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 피하, 근육 내, 척수강 내, 관절 내 및 직접 주사를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약제학적 조성물은 인간 환자, 고양이, 개, 대동물 또는 조류에게 투여될 수 있다. 조성물은 하루에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 회 투여될 수 있다.

[0049] **b. 조합 치료**

[0050] 본원에 기재된 CD24 단백질은 재수초화를 촉진시키거나 회돌기교세포에서 회돌기교세포 전구체 세포의 전환을 촉진하는 데 사용되는 다른 치료법과 결합될 수 있다. 이러한 치료의 예는 항-링고-1, NDC-1308, 항-에프린B3,

클레마스틴 푸마 레이트, 플루오로사민 및 핑골리모드를 포함한다. 링고-1은 미성숙 세포가 회돌기교세포가 되는 것을 막는 CNS에 의해 생산된 단백질이며, 항-링고 (오피시누맵)는 링고-1의 작용을 막아 이들 세포가 회돌기교세포로 성숙하게 한다. NDC-1308은 탈수초화된 신경 섬유의 수초를 수리하도록 설계되었으며 특히 운동 뉴런 손상을 치료하기 위한 것이다. 에프린B3는 MS에서 손상된 뉴런의 재수초화를 차단하는 막 결합 신호 단백질이므로 항-에프린은 이 차단을 역전시키도록 설계되었다. 플루오로사민은 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 합성을 방지하고 회돌기교세포 기능을 촉진함으로써 마우스에서 재수초화를 증가시키는 것으로 나타났다. 유사하게, 신경 염증을 예방하기 위해 재발성 다발성 경화증 환자에 대해 승인된 약물인 핑골리모드(GILENYA)는 또한 항염증 특성과 부분적으로 독립적인 방식으로 신경 재생을 직접 향상시키고 수초화를 증가시킴으로써 이들 환자를 도울 수 있다.

[0051] CD24 단백질은 다른 치료와 동시에 또는 기계적으로 규칙적이며 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "동시의(simultaneous)" 또는 "동시에(simultaneously)"는 CD24 단백질 및 다른 치료가 서로 48 시간, 바람직하게는 24 시간, 보다 바람직하게는 12 시간, 더욱 바람직하게는 6 시간, 가장 바람직하게는 3 시간 이내에 투여됨을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "기계적으로 규칙적이며(metronomically)"는 반복 투여에 대해 다른 치료와 다른 시점 및 특정 빈도로 제제의 투여를 의미한다.

[0052] CD24 단백질은 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, 50 시간, 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 포함하는 다른 치료 전에 임의의 시점에 투여될 수 있다. CD24 단백질은 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, 50 시간, 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 포함하는 CD24 단백질의 또 다른 치료 전에 임의의 시점에 투여될 수 있다.

[0053] CD24 단백질은 약 1 분, 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 및 120 시간을 포함하는 다른 치료 후 임의의 시점에 투여될 수 있다. CD24 단백질은 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, 50 시간, 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 포함하는 사전 CD24 치료 후 임의의 시점에 투여될 수 있다.

[0054] 실시예 1

[0055] 마우스의 CD24 약동학

[0056] 1mg의 CD24Fc (CD24Fc)를 나이브 C57BL/6 마우스에 주사하고 3 마리의 마우스로 상이한 시점 (5 분, 1 시간, 4

시간, 24 시간, 48 시간, 7 일, 14 일 및 21 일)에 각 시점에서 혈액 샘플을 수집하였다. 혈청을 1:100으로 희석하고, 포획 항체로서 정제된 항-인간 CD24 (3.3 µg/ml) 및 검출 항체로서 퍼옥시다제 접합된 염소 항-인간 IgG Fc (5 µg/ml)를 사용하여 샌드위치 ELISA를 사용하여 CD24Fc의 수준을 검출하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, CD24Fc의 붕괴 곡선은 단백질의 전형적인 2 상 붕괴를 나타냈다. 첫 번째 생체 분포 단계의 반감기는 12.4 시간이었다. 두 번째 단계는 중앙 구획에서 1 차 제거 모델을 따른다. 두 번째 단계의 반감기는 9.54 일로, 생체 내 항체의 반감기와 유사하다. 이들 데이터는 융합 단백질이 혈류에서 매우 안정하다는 것을 시사한다. 융합 단백질을 피하 주사한 다른 연구에서, 9.52 일의 거의 동일한 반감기가 관찰되었다 (도 3b). 더욱 중요하게는, CD24Fc가 혈액에서 최고 수준에 도달하는데 약 48 시간이 걸렸지만, AUC에 의해 측정된 바와 같이 혈액에서 융합 단백질의 총량은 어느 주사 경로에서도 실질적으로 동일하였다. 따라서, 치료적 관점에서, 상이한 주사 경로는 약물의 치료 효과에 영향을 미치지 않아야 한다. 이 관찰은 영양류 독성 및 임상 시험을 위한 실험 설계를 크게 단순화시켰다.

[0057] 실시예 2

[0058] 조직 손상에 대한 숙주 반응에서 CD24-시글렉 10 상호 작용

[0059] 거의 20 년 전에 Matzinger는 대중적으로 위험 이론으로 불리는 것을 제안했다. 본질적으로, 그녀는 면역계가 숙주의 위험을 감지할 때 켜져 있다고 주장했다. 비록 위험의 본질은 당시에 잘 정의되지 않았지만, 위험 관련 분자 패턴에 대해, 피사가 DAMP라고 불리는, 열 충격 단백질 및 HMGB1과 같은 세포 내 성분의 방출과 관련이 있는 것으로 측정되었다. DAMP는 염증성 사이토카인 및 자가 면역 질환의 생성을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 동물 모델에서, HMGB1 및 HSP90의 억제제는 RA를 개선시키는 것으로 밝혀졌다. DAMP의 관련은 DAMP에 대한 숙주 반응에 대한 음성 조절이 RA 요법에 대해 탐구될 수 있다는 전망을 높였다.

[0060] 아세트 아미노펜-유도 간 피사를 사용하고 염증을 보장함으로써, 시글렉 G와의 상호 작용을 통해, CD24는 조직 손상에 대한 숙주 반응에 대한 강력한 음성 조절을 제공하는 것으로 관찰되었다. CD24는 조혈 세포 및 다른 조직 줄기 세포에서 광범위하게 발현되는 GPI 고정 분자이다. 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, RA 및 거대 세포 관절염을 포함한 인간의 다양한 자가 면역 질환의 유전자 분석은 CD24 다형성과 자가 면역 질환의 위험 사이에 유의한 연관성을 보여 주었다. 시글렉 G는 시알산 함유 구조를 인식하는 능력에 의해 정의된, I-렉틴 패밀리의 구성원이다. 시글렉 G는 CD24 상의 시알산 함유 구조를 인식하고 수지상 세포에 의한 염증성 사이토카인의 생성을 음성으로 조절한다. CD24와의 상호 작용 능력에 있어서, 인간 시글렉 10 및 마우스 시글렉 G는 기능적으로 동등하다. 그러나 마우스와 인간 동족체 사이에 일대일 상관 관계가 있는지는 확실하지 않는다. 메카니즘은 완전히 밝혀져 있지만, 시글렉 G 관련 SHP1이 음성 조절에 관여할 가능성이 있다. 이러한 데이터는 CD24-시글렉 G/10 상호 작용이 DAMP로부터의 차별 병원체-연관 분자 패턴 (PAMP)에서 결정적인 역할을 할 수 있는 새로운 모델로 이어졌다 (도 4).

[0061] 적어도 2 개의 중첩 메커니즘이 CD24의 기능을 설명할 수 있다. 먼저, 다양한 DAMP에 결합함으로써 CD24는 염증 자극을 포착하여 TLR 또는 RAGE와의 상호 작용을 방지할 수 있다. 이 개념은 CD24가 HSP70, 90, HMGB1 및 뉴클레오타이드를 포함한 여러 DAMP 분자와 연관되어 있다는 관찰에 의해 뒷받침된다. 둘째, 아마도 DAMP와 관련된 후, CD24는 시글렉 G에 의한 신호 전달을 자극할 수 있다. 두 메커니즘 모두 어느 쪽이든 더 강한 염증 반응이 장착된 유전자의 표적화된 돌연변이를 갖는 마우스로서 함께 작용할 수 있다. 실제로, CD24-/- 또는 시글렉 G-/-마우스로부터 골수로부터 배양된 DC는 HMGB1, HSP70 또는 HSP90으로 자극될 때 훨씬 더 높은 염증성 사이토카인을 생산하였다. 대조적으로, LPS 및 PolyI:C와 같은 PAMP에 대한 반응에서 효과는 발견되지 않았다. 이들 데이터는 선천성 면역계가 병원체를 조직 손상과 구별하기 위한 메커니즘을 제공했을 뿐만 아니라, CD24 및 시글렉 G를 조직 손상과 관련된 질병에 대한 잠재적 치료 표적으로서 시사한다.

[0062] 실시예 3

[0063] 생체 외 미엘린 관련 당단백질 (MAG)과 CD24Fc의 결합

[0064] 시글렉-4로도 알려진, 미엘린 관련 당단백질 (MAG)은 시알산 함유 구조를 인식하고 뉴런의 축색 돌기에서 발현되며 축색 돌기 성장 및 뉴런 재생을 위한 음성 조절자로 기능하는 시글렉 패밀리의 구성원이다. MAG 단백질은 마우스 모델에서 CD24Fc의 시험을 허용하여 마우스와 인간 사이에 보존된다. CD24Fc의 MAG에 대한 결합을 확인하기 위해, 인간 IgG1의 카르복실-말단 Fc 영역에 폴리펩티드 링커에 의해 융합된 랫트 MAG의 세포 외 도메인을 포함하는 재조합 MAG-Fc 융합 단백질을 사용하였다 (Sigma 제품 번호 M 5063). 인간 MAG (Genbank 수탁 번호 NP_002352) 및 랫트 MAG (Genbank 수탁 번호 NP_058886)의 세포 외 도메인은 96% 동일하다.

- [0065] CD24Fc와 MAG의 상호 작용은 Biacore 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석에 의해 검출하였다. 간략하게, CD24Fc 및 인간 IgG Fc 대조군 둘 모두를 바이오티나화시키고 스트렙타비딘으로 사전 고정화된 센서 칩 상에 고정화시켰다. 센서 칩 표면을 제조한 후, 상이한 농도 (1, 6 및 24 μ M)의 10 μ l MAG-Fc를 유동 채널에 순차적으로 주입하였다. 각각의 주사 후 용리액으로서 HBS로 세척함으로써 10 분의 해리가 이어졌다. 센서 표면 상에 고정된 CD24Fc 또는 인간 IgG Fc에 대한 MAG-Fc의 결합은 결합된 질량에 비례하는 반응을 생성하였다. 반응은 공명 단위 (RU)로 측정되며, 이는 상이한 농도의 MAG-Fc의 주입 후 기록된 신호 변화를 반영한다.
- [0066] 시간에 대한 반응 단위의 실시간 그래프는 인간 IgG Fc와 비교하여, CD24Fc가 MAG-Fc에 대해 더 높은 결합을 가짐을 입증하였다. 특이적 결합은 용량-의존적 방식으로 제시된다 (도 5). 따라서, CD24Fc는 축삭 성장 및 뉴런 재생 동안 MAG의 기능을 잠재적으로 차단할 수 있다.
- [0067] **실시예 4**
- [0068] **전임상 모델에서 CD24Fc의 치료 효능**
- [0069] EAE의 지속적인 임상 징후를 사용한 동물 치료.
- [0070] 8 내지 12 주령의 C57BL/6 마우스를 총 부피 100 μ L 중 CFA (밀리리터 당 400 μ g의 결핵균)에서 200 μ g MOG (랫트 기원의 펩타이드 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)로 200 μ g 피하 면역시켰다. 각 마우스는 면역 직후 및 48 시간 후에 다시 꼬리 정맥에서 200 μ L PBS 중 200 ng의 백일해 독소 (List Biological, Campbell, California, USA)를 받았다. 마우스를 격일마다 관찰하였고 중간 점수에 대해 0.5의 단계로 0 내지 5의 척도로 점수를 매겼다: 0, 임상 징후 없음; 1, 꼬리 톤의 손실; 2, 흔들거리는 보행; 3, 뒷다리 마비; 4, 앞다리 및 뒷다리 마비; 5, 죽음. 면역화 후 14 내지 21 일에, 임상 점수가 2.5 내지 3.5인 마우스를 2 개의 그룹으로 무작위로 나누고 대조군 IgG1 Fc 또는 CD24Fc로 처리하였다. 격일로 200 g/마우스의 5 회 주사를 복강 내 (i.p.) 투여하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, CD24Fc는 유의하고 용량 의존적인 치료 효과를 가졌다.
- [0071] 프라이밍된 자가 반응성 T 세포를 이용한 동물의 치료.
- [0072] CD24Fc가 자가 반응성 T 세포의 파괴를 예방할 수 있는지 시험하기 위해, 면역화 후 7 일째에 면역화 마우스를 처리하였다. 이 시점에서, 림프절에서 MOG 반응성 T 세포를 찾을 수 있었지만, 임상 증상은 관찰되지 않았다. 면역화 후 7 일째에, 면역화된 마우스를 그룹 당 9 마리 마우스의 2 개 그룹으로 나누고, 총 5회 주사 (7, 9, 11, 13 및 15 일) 동안 격일로 대조군 면역 글로불린 (Ig) 또는 CD24Fc 융합 단백질로 복강 내 (200 μ g/주사/마우스) 처리하였다. 상기 기술된 바와 같이 임상 증상에 대해 점수를 얻기 위해 마우스를 매일 검사하였다.
- [0073] 도 7에 도시된 바와 같이, 대조군 IgG 또는 CD24Fc의 투여 후 2 일에, CD24Fc로 처리된 군은 대조군과 비교하여 임상 증상의 발달이 지연된 것으로 나타났다. 두 그룹의 모든 데이터를 고려할 때, 두 가지 통계 분석에서 매우 중요한 차이가 나타났다 ($P=0.0019$, 피셔의 PLSD 테스트). 이들 결과는 CD24Fc 융합 단백질로의 치료로 EAE의 임상 증상이 지연되고 감소될 수 있음을 입증한다.
- [0074] 최소 유효량을 결정하기 위해, 본 발명자들은 MOG 면역화된 마우스에 CD24Fc의 100, 50 및 25 μ g/주사를 주사하였다. 우리는 종말점으로 1 개월 동안 누적 질환 점수에서 50%의 감소를 사용했다. 도 8에 도시된 바와 같이, 용량 의존적 억제에 관찰되었다. 용량 반응 곡선은 로그 곡선과 잘 맞았으며, 이는 80 μ g/주입이 누적 질환 점수에서 50% 감소를 나타냄을 나타냈다.
- [0075] SJL 모델에서 재발성 배출 EAE의 치료.
- [0076] C57BL/6 마우스의 EAE는 압도적인 다수의 MS 환자에서 나타나는 만성 과정과 다른 급성 임상 과정을 가지고 있다. 다량의 MS 환자는 재발 방출 임상 과정을 가지고 있으며, 이는 EAE의 SJL 모델에서 가장 잘 모방된다. 따라서 우리는 SJL 모델에서 치료 잠재력을 시험했다. 치료 요법은 상기 실험과 동일하였다. 간략하게, 면역화 후 7 일에, 면역화된 마우스를 그룹 당 14 또는 15 마리 마우스의 2 개 그룹으로 나누고, 총 5 회 주사 (7, 9, 11, 13 및 15 일) 동안 격일로 매회 본 발명의 비히클 대조군 또는 본 발명의 CD24Fc 융합 단백질로 복강 내 (200 μ g/주사/마우스) 처리하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, CD24Fc로 SJL 마우스를 처리하면 임상 점수가 실질적으로 감소되었다 ($P=0.0039$, 피셔의 PLSD 테스트).
- [0077] **실시예 5**
- [0078] **진행 중인 실험적 자가 면역 뇌척수염을 갖는 마우스에서 중추 신경 시스템에 CD24Fc의 생체 분포.**
- [0079] 중추 신경계 (CNS)는 다발성 경화증에 대한 면역 요법의 표적 기관이다. 이 연구의 목적은 진행 중인 나이브

마우스 및 실험적 자가 면역 뇌척수염 (EAE)을 갖는 마우스의 CNS에서 CD24Fc의 생체 분포를 조사하는 것이다.

[0080] 도 10의 결과는 CD24Fc 투여 24 시간 후, 나이브 마우스는 매우 낮지만 검출 가능한 수준의 CD24Fc (23 ng/ml)를 가짐을 보여준다. 그러나, 진행 중인 EAE를 갖는 마우스에서, CD24Fc 수준은 약 18 μ g/ml였으며, 이는 나이브 마우스의 CNS에서보다 780 배 이상 높다. 증가가 매우 유의성이 있다 ($P < 0.001$, 비-모수 만-휘트니 T 검정). CNS에서 CD24Fc의 수준은 생체 외 억제 검정에 기초한 유효 범위 내에 상당히 있다. 따라서, CD24Fc는 CNS에 접근하여 다발성 경화증 (MS) 환자의 CNS에서 국소적으로 치료 효과를 제공할 수 있다.

[0081] 실시예 6

[0082] 탈수초성 질환 및 신경 보호 치료를 위한 CD24의 사용

[0083] 이 실시예는 CD24 단백질이 탈수초성 질환 및 신경-면역 질환을 치료하고, 신경 보호를 제공하며, 희돌기교세포를 유지하는데 사용될 수 있음을 입증한다. 쿠프리존의 만성 노출은 설치류에서 희돌기교세포 손실을 유도하는 고전적인 모델이다 (5). 여러 그룹이 희돌기교세포의 손실에서의 염증에 대한 중요한 역할을 보고하였다. 그러나 희돌기교세포 손실에 대한 개시 신호의 특성은 명확하게 묘사되지 않았다. Janeway는 선천성 면역은 주로 병원체 관련 분자 패턴 또는 PAMP라고 불리는 미생물 생성물의 패턴 인식을 통해 시작된다고 제안했다 (6, 7). 이후에, Matzinger는 선천성 면역 반응을 개시하는 열쇠로 나중에 다른 사람들에 의해 DAMP라고 명명된 위험 신호를 제안했다 (8). 본 발명자들에 의한 연구에 따르면 PAMP 및 DAMP에 의해 유발된 염증은 CD24-시글렉 G 상호 작용에 의해 PAMP에 영향을 미치지 않으면서 DAMP에 대한 숙주 반응을 선택적으로 향상시키는 유전자 중 어느 하나의 표적화된 돌연변이로서 구별될 수 있다 (9, 10). 여기서, CD24의 잠재적인 새로운 용도에 대한 본 발명자들의 통찰에 따라, 만성 쿠프리존 치료 후 희돌기교세포 생존에서 Cd24 또는 시글렉g 유전자의 표적화된 돌연변이의 영향을 평가함으로써 DAMP에 대한 선천적 면역 반응의 잠재적 기여를 조사하였다.

[0084] 연령 및 성별 일치 WT, Cd24^{-/-} 및 시글렉g^{-/-} 마우스 (9, 10)를 4 주 동안 CPZ로 처리하고, 처리 후 4 주에 안락사 시켰다. 희돌기교세포의 회복을 모니터링하기 위해, 마우스를 먼저 5 주 동안 처리하고 10 일 동안 정상 식이로 10 일 동안 회복시킨 다음 분석을 위해 안락사시켰다. 브레그마-1 영역 (도 11a)을 절개하고 희돌기교세포 계통의 모든 세포에 특이적으로 결합하는 항-올리고-2 항체를 사용한 면역 형광 염색에 의해 희돌기교세포 수에 대해 분석하였다. 대표 이미지는 도 11b에 도시되어 있고, 요약 데이터가 도 11c에 도시되어 있다. 도 11b에 도시된 바와 같이, 3 가지 종의 마우스 모두 CPZ 처리 전에 유사한 수의 희돌기교세포를 가졌다. 이러한 데이터는 Cd24 및 시글렉g가 이 영역에서 희돌기교세포의 발달에 관여하지 않음을 시사한다. 그러나, Cd24 또는 시글렉g 유전자의 표적화된 돌연변이는 CPZ 처리 후 4 주에 희돌기교세포의 더 심각한 고갈을 초래했다. 더욱이, 희돌기교세포 수는 WT 마우스에서 회복 기간 10 일 후에 완전히 회복되었지만, Cd24^{-/-} 및 시글렉g^{-/-} 뇌에서 부분 회복만이 관찰되었다 (도 11c). 이 데이터는 CD24-시글렉 G 축이 희돌기교세포를 CPZ 독성으로부터 보호한다는 것을 입증한다.

[0085] 시글렉 G 작용제 CD24Fc (9, 10) (미국 특허 공개 번호 20130231464에 기재되어 있고, 그 내용이 본원에 참조로 포함됨)를 희돌기교세포를 보호하기 위해 전신적으로 투여할 수 있는지를 측정하기 위해, CD24Fc가 전신 투여를 통해 CNS에 전달될 수 있는지를 먼저 측정하였다. CD24Fc 10mg을 8 주령 마우스에 복강 내 주사하였다. 1 일, 7일, 14 일, 21 일 및 28 일에 혈청 및 CSF를 수집하고, 샌드위치 ELISA에 의해 CD24Fc의 양을 측정하였다. 도 11d에 도시된 바와 같이, CD24Fc는 혈장에서 관찰된 것과 거의 유사한 수준으로, 4 주 동안의 관찰 기간 내내 CSF에서 발견될 수 있다. CSF CD24Fc 수준은 혈장 수준의 약 0.2 내지 0.3%이다. 4 주에서 발견된 수준은 대식세포에 의한 염증성 사이토카인의 생성을 억제하기 위한 검정에서 CD24Fc의 IC50보다 더 높았다.

[0086] 올리고2+ 희돌기교세포의 제자리 분석에 기초하여, CPZ 처리 후 2 주 및 4 주에 CD24Fc의 보호 효과를 분석하였다. 이 부위가 CPZ 처리 동안 더 많은 병리학적 손상을 입었기 때문에 뇌량의 브레그마-1 위치 희돌기교세포 수 (도 11e)를 분석하였다. CD24Fc 처리는 CPZ-처리 후 2 주 및 4 주 모두에서 희돌기교세포의 수를 유의하게 증가시키는 것으로 관찰되었다 (도 11f).

[0087] 희돌기교세포의 손실은 일반적으로 재수초화 감소와 관련이 있기 때문에, 시글렉g 유전자의 CD24의 대상 돌연변이가 가속 탈수초화를 유발하는지 여부를 추가로 조사했다. 놀랍게도, 더 심각한 탈수초화는 어느 마우스 종에서도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 개선된 희돌기교세포 생존이 재수초화를 유도하기에 충분하지 않을 수 있음을 시사했다.

[0088] 종합하면, 본원에 기재된 데이터는 CD24-시글렉 G 축이 CPZ 사멸에 대해 희돌기교세포를 보호하고, 따라서 CPZ

모델에서 회돌기교세포 손실에 대한 인식되지 않은 원인으로서는 DAMP에 대한 숙주 반응에 연루되었음을 입증한다. 회돌기교세포 손실의 병인에 대한 새로운 통찰은 *생체 내에서* 회돌기교세포 생존을 촉진하는 새로운 접근 방식을 제안한다. 이러한 개념에 따라, DAMP (9, 10)에 결합하고 시글렉 G (9, 10)의 작용제로 작용하는 CD24Fc의 전신 투여는 CPZ에 의한 사멸에 대해 회돌기교세포를 보호하기에 충분하다는 것이 밝혀졌다. 회돌기교세포의 손실 여러 신경퇴행성 질병에 연루되어 있기 때문에 (1-4), 데이터는 세포 손상에서 숙주 반응이 이러한 다루기 힘든 신경 질환의 치료 개발을 위해 탐구될 수 있음을 시사한다. 마지막으로, CD24는 자가 반응성 T 세포 (12) 및 간내 CD4 T 세포 (13)를 포함하는, T 세포 (11)의 활성화를 위한 공동 자극 분자로도 알려져 있다는 것을 주의해야 한다. 상응하게, CD24Fc는 또한 자가 면역 질환을 억제하는 것으로 나타났다 (14). CD24Fc는 자가 면역 질환에서 Cd24 유전자의 유전적 결함을 표현형 모사하기 때문에 (12, 14), 길항제로서 다른 메커니즘을 통해 작용할 가능성이 있다.

[0089] 실시예 7

[0090] 인간의 CD24 약동학

[0091] 이 실시예는 인간에서 CD24 단백질의 약동학 분석을 보여준다. 이는 건강한 남성 및 여성 성인 대상체에서 CD24Fc의 안전성, 내약성 및 PK를 평가하기 위한 1 상, 무작위, 이중 맹검, 위약-제어, 단일 상승 용량 연구로부터 도출되었다. 이 연구에는 각각 8 명의 대상체의 5개의 코호트에서 총 40 명의 피험자가 등록되었다. 각 코호트에서 8 명의 대상체 중 6 명은 연구 약물을, 2 명의 대상은 위약 (0.9% 염화나트륨, 식염수)을 받았다. 첫 번째 코호트에 10 mg을 투여하였다. 후속 코호트는 30mg, 60mg, 120mg 및 240mg의 CD24Fc 또는 상응하는 위약을 투여받았으며, 각각의 이전 코호트에 대한 안전성 및 내약성 데이터를 검토할 수 있도록 3 주 이상 간격을 두었다. 적절한 안전성과 내약성이 입증된 경우에만 새로운 대상체 집단에 다음 고용량을 투여하는 것이 허용되었다.

[0092] 각 코호트에서, 최초 2 명의 대상체는 1 일째 연구 약물 수용자 1 명 및 위약 수용자 1 명이였다. 제 3 내지 제 5 및 제 6 내지 제 8 피험자들은 7 일 (하위 그룹 사이에서 최소 24 시간 간격) 후에 투약되었다. 각각의 대상체에 동일한 하위 군에서 1 시간 이상 간격을 두었다. 필요한 경우, 나머지 피험자의 투약은 해당 코호트의 첫 번째 또는 두 번째 하위 그룹과 관련된 투약 후 기간 동안 발생할 수 있는 중대한 안전 문제를 검토하는 동안 지연되었다. 후속 코호트는 이전 코호트 후 적어도 3 주에 투여되었다.

[0093] 스크리닝 기간:

[0094] 스크리닝 방문 (방문 1)은 활성 치료 기간이 시작되기 전 21 일 전에 발생하였다. 사전 동의를 얻은 후, 대상체들은 자격 심사 절차를 거쳤다.

[0095] 치료 기간:

[0096] 대상체를 제 1 일 (방문 2)에 임상 약리학 유닛 (CPU)에 입원시켰고, 무작위 치료 기간은 최소 10 시간 밤새 금식 후 제 1 일에 시작하였다. 대상체를 단일 용량으로서 CD24Fc 또는 위약으로의 치료에 무작위로 할당하였다. 대상체는 4 일차 아침까지 갇혀 있었다.

[0097] 후속 조치:

[0098] 모든 대상은 추적 방문 (방문 3, 방문 4, 방문 5, 방문 6 및 방문 7)을 위해 7 일, 14 일, 21 일, 28 일 및 42 일 (± 1 일)에 CPU로 돌아왔다. 방문 7은 모든 대상체에 대한 최종 방문이었다.

[0099] 치료 기간: 각 과목의 총 연구 기간은 최대 63 일이었다. 1 일에 단일 용량 투여가 발생했다.

[0100] 대상체 수:

[0101] 계획: 40 대상체

[0102] 스크리닝: 224 대상체

[0103] 무작위 배정: 40 대상체

[0104] 완료: 39 대상체

[0105] 중단: 1 대상체

[0106] 포함을 위한 진단 및 주요 기준: 본 연구의 집단은 18kg/m^2 내지 30kg/m^2 까지의 체질량 지수를 가지는 18 내지

55 세까지의 건강한 남성과 여성이었다.

[0107] 조사 제품 및 비교기 정보:

[0108] CD24Fc: IV 주입을 통해 투여되는 10mg, 30mg, 60mg, 120mg 또는 240mg의 단일 용량; 로트 번호: 09MM-036. CD24Fc는 인간 CD24의 성숙 서열 및 인간 면역 글로불린 G1 (IgG1Fc)의 결정화 가능한 영역으로 구성된 완전 인간화된 융합 단백질이었다. CD24Fc는 IV 투여를 위해 멸균, 투명, 무색, 방부제가 없는 수용액으로서 공급되었다. CD24Fc를 10mg/mL의 농도 및 pH 7.2의 단일 용량 주사 용액으로 제제화하였다. 각각의 CD24Fc 바이알은 16mL±0.2mL의 CD24Fc에 160mg의 CD24Fc, 5.3mg의 염화나트륨, 32.6mg의 인산 나트륨 이염기성 수화물 및 140mg의 인산 나트륨 일염기성 일수화물을 함유하였다. CD24Fc를 클로로부틸 고무 마개 및 알루미늄 플립-오프 씰과 함께 투명한 봉규산 유리 바이알에 공급하였다.

[0109] IV 주입을 통해 투여되는 매칭 위약 (0.9% 염화나트륨, 식염수); 로트 번호: P296855, P311852, P300715, P315952.

[0110] 치료 의도 (ITT) 집단은 적어도 1 회 용량의 연구 약물을 받은 모든 대상체로 구성되었다. ITT 집단은 피험자 정보 및 안전성 평가를 위한 주요 분석 집단이었다.

[0111] 임상 실험실 평가 (화학, 혈액학 및 소변 검사)는 치료 및 방문에 의해 요약되었다. 기준으로부터의 변화도 요약되었다. 활력 징후 (혈압, 심박수, 호흡 수 및 온도)를 치료 및 시점으로 요약하였다. 기준으로부터의 변화도 요약되었다. 모든 신체 검사 데이터가 나열되었다. 심전도 매개변수 및 기준선으로부터의 변화가 요약되었다. 전반적인 해석이 나열되었다.

[0112] 혈장 CD24Fc 농도

[0113] 도 12에 도시된 바와 같이, CD24Fc의 평균 혈장 농도는 투여된 CD24Fc의 용량에 비례하여 증가하였다. 120mg을 제외한 모든 용량 그룹에 대해, CD24Fc의 최대 평균 혈장 농도는 투여 후 1 시간에 도달하였다. 120 mg 그룹에 대한 CD24Fc의 최대 평균 혈장 농도는 투여 후 2 시간에 도달하였다. 42 일 (984 시간)까지, 모든 그룹에 대한 CD24Fc의 평균 혈장 농도는 최대 평균 혈장 농도의 2% 내지 4%로 감소하였다.

[0114] 표 1은 PK 평가 가능한 집단에 대한 처리에 의한 혈장 CD24Fc PK 파라미터를 요약한 것이다.

[0115] 표 1 치료에 의한 혈장 CD24Fc 약동학 매개 변수의 요약 - PK 평가 가능 집단

모수 통계	CD24Fc 10 mg (N = 6)	CD24Fc 30 mg (N = 6)	CD24Fc 60 mg (N = 6)	CD24Fc 120 mg (N = 6)	CD24Fc 240 mg (N = 6)
C _{max} (ng / mL)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	2495 (576)	9735 (1715)	30 083 (7179)	52 435 (9910)	95 865 (10 734)
CV %	23.1	17.6	23.9	18.9	11.2
중앙값	2371	9218	29 026	50 401	93 206
최소, 최대	1,967, 3,390	8,583, 13,086	22,557, 42,628	40,434, 65,704	81,296, 110,110
기하 평균	2,442	9,625	29,424	51,666	95,365
기하학적 CV %	22.8	16.1	23.0	19.0	11.2
AUC _{0-42d} (ng*hr/mL)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	423,061 (99,615)	1,282,430 (88,798)	3,226,255 (702,862)	6,541,501 (2,190,944)	12,704,705 (1,918,596)
CV %	23.5	6.9	21.8	33.5	15.1
중앙값	434,043	1,302,719	3,124,933	5,785,142	12,563,426
최소, 최대	291,020, 528,079	1,175,733, 1,403,024	2,487,550, 4,139,748	4,485,193, 9,415,266	10,466,635, 15,693,606
기하 평균	412,795	1,279,851	3,163,252	6,249,552	12,586,731
기하학적 CV %	25.0	7.0	22.0	33.8	15.0
AUC _{0-inf} (ng*hr/mL)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	462,260 (116,040)	1,434,464 (131,316)	3,497,196 (705,653)	7,198,196 (2,458,320)	13,861,796 (1,962,780)
CV %	25.1	9.2	20.2	34.2	14.2
중앙값	470,426	1,422,205	3,519,732	6,463,665	13,713,034
최소, 최대	310,956, 596,599	1,281,715, 1,650,503	2,703,655, 4,309,023	4,910,640, 10,479,940	11,822,988, 17,175,236
기하 평균	449,583	1,429,578	3,437,036	6,862,129	13,750,972
기하학적 CV %	26.7	9.0	20.7	34.6	13.8
T _{max} (시간)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	1.15 (0.42)	1.17 (0.41)	1.01 (0.01)	1.34 (0.51)	1.33 (0.52)

[0116]

모수 통계	CD24Fc 10 mg (N = 6)	CD24Fc 30 mg (N = 6)	CD24Fc 60 mg (N = 6)	CD24Fc 120 mg (N = 6)	CD24Fc 240 mg (N = 6)
CV %	36.1	35.0	1.2	38.0	38.7
중앙값	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00
최소, 최대	0.92, 2.00	1.00, 2.00	1.00, 1.03	1.00, 2.00	1.00, 2.00
t _{1/2} (시간)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	280.83 (22.37)	327.10 (41.32)	279.82 (65.59)	286.45 (23.38)	285.33 (24.33)
CV %	8.0	12.6	23.4	8.2	8.5
중앙값	279.61	317.23	264.69	290.76	287.74
최소, 최대	258.87, 321.26	289.82, 394.24	210.18, 362.46	243.89, 309.26	249.24, 322.26
AUC _{extr} (%)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	7.61 (2.14)	10.44 (2.94)	7.88 (4.26)	8.92 (1.94)	8.46 (1.99)
CV %	28.1	28.2	54.0	21.8	23.5
중앙값	7.16	10.01	6.35	9.27	8.45
최소, 최대	5.46, 11.47	7.10, 15.05	3.92, 14.48	5.49, 10.99	5.56, 11.50
CL (L/시간)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	0.0229 (0.0061)	0.0211 (0.0019)	0.0178 (0.0036)	0.0183 (0.0058)	0.0176 (0.0023)
CV %	26.7	8.8	20.5	31.7	13.3
중앙값	0.0216	0.0211	0.0173	0.0191	0.0175
최소, 최대	0.0168, 0.0322	0.0182, 0.0234	0.0139, 0.0222	0.0115, 0.0244	0.0140, 0.0203
V _d (L)					
n	6	6	6	6	6
평균 (SD)	9.153 (1.943)	9.867 (0.804)	7.289 (2.592)	7.491 (2.202)	7.276 (1.426)
CV %	21.2	8.1	35.6	29.4	19.6
중앙값	8.507	10.007	7.486	7.691	7.151
최소, 최대	7.326, 12.010	8.771, 10.958	4.222, 11.139	4.933, 9.974	5.814, 9.438
AUC _{0-42d} = 0 내지 42 일의 농도-시간 곡선 아래 면적; AUC _{0-inf} = 시간 0 에서 무한대까지 외삽된 농도-시간 곡선 아래 면적; AUC _{extr} = 대상체 당 최종 측정 가능한 농도의 시간으로부터 무한대까지 외삽으로 인한 AUC					

모수 통계	CD24Fc 10 mg (N = 6)	CD24Fc 30 mg (N = 6)	CD24Fc 60 mg (N = 6)	CD24Fc 120 mg (N = 6)	CD24Fc 240 mg (N = 6)
C _{0-inf} 의 백분율; CL = 총 신체 소실; C _{max} = 최대 관찰된 혈장 약물 농도; CV % = 변동 계수; Min = 최소; Max = 최대; SD = 표준 편차; t _{1/2} = 말단 제거 반감기; T _{max} = 최대 관찰된 혈장 약물 농도의 시간; V _d = 분포량.					

혈장 CD24Fc 용량 비례 분석

도 13은 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc C_{max} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 도 14는 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc AUC_{0-42d} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 도 15는 PK 평가 가능한 집단에 대한 CD24Fc AUC_{0-inf} 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 표 2는 용량 비례의 파워 분석을 보여준다.

표 2 용량 비례의 파워 분석: 플라즈마 CD24Fc 약동학 매개 변수 - PK 평가 가능한 집단

모수 통계	CD24Fc 10 mg (N = 6)	CD24Fc 30 mg (N = 6)	CD24Fc 60 mg (N = 6)	CD24Fc 120 mg (N = 6)	CD24Fc 240 mg (N = 6)	용량 비례		
C_{max} (ng / mL)						기울기 추정	표준 오차	CI 90 %
기하 평균	2441.8	9624.9	29424.4	51666.4	95364.9	1.172	0.040	(1.105, 1.240)
기하학적 CV %	22.8	16.1	23.0	19.0	11.2			
AUC_{0-42d} (ng*hr/mL)						1.088	0.036	(1.027, 1.148)
기하 평균	412794.8	1279850.8	3163251.7	6249551.9	12586731.3			
기하학적 CV %	25.0	7.0	22.0	33.8	15.0			
AUC_{0-inf} (ng*hr/mL)						1.087	0.036	(1.026, 1.148)
기하 평균	449583.5	1429577.5	3437035.6	6862128.7	13750972.4			
기하학적 CV %	26.7	9.0	20.7	34.6	13.8			

기하학적 CV% = $100 \times \sqrt{\frac{CV^2}{n}}$ (exp(SD²)-1), 여기서 SD는 로그 변환된 데이터의 표준 편차이다. 파워 모델은 로그 변환 선형에서 로그 변환된 PK 매개 변수를 회귀하여 제한된 최대 가능성에 의해 적합화되었다. 전환과 기울기 모두 고정 효과로 장착되었다. 90% CI가 (0.8, 1.25) 내에 있으면 용량 비례는 기각되지 않았다.
 $AUC_{0-42d} = 0$ 내지 42 일의 농도-시간 곡선 아래 면적; AUC_{0-inf} = 시간 0에서 무한대까지 외삽된 농도-시간 곡선 아래 면적; CI = 신뢰 구간; C_{max} = 최대 관찰된 혈장 약물 농도; CV % = 변동 계수; PK = 약동학; SD = 표준 편차.

[0121]

[0122]

C_{max} 기울기 추정치는 90% CI가 1.105 내지 1.240인 1.172이었다. AUC_{0-42d} 기울기 추정치는 90% CI가 1.027 내지 1.148인 1.088이었다. AUC_{0-inf} 기울기 추정치는 90% CI가 1.026 내지 1.1인 1.087이었다.

[0123]

약동학적 결론

[0124]

혈장 CD24Fc의 C_{max} 및 AUC는 마우스, 원숭이 및 인간에서 투여된 용량에 비례하여 증가하였다. 혈장 CD24Fc는 1.01와 1.34 시간 사이에 T_{max} 에 도달했다. 혈장 CD24Fc의 $t_{1/2}$ 는 280.83 내지 327.10 시간 범위였다.

[0125]

참고 문헌

[0126]

1 Nave, K. A. & Trapp, B. D. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 535-561, doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309 (2008).

[0127]

2 Rivera, A., Vanzuli, I., Arellano, J. J. & Butt, A. Decreased Regenerative Capacity of Oligodendrocyte Progenitor Cells (NG2-Glia) in the Ageing Brain: A Vicious Cycle of Synaptic Dysfunction, Myelin Loss and Neuronal Disruption? *Current Alzheimer research* **13**, 413-418 (2016).

- [0128] 3 Cai, Z. & Xiao, M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* **126**, 97-104, doi:10.3109/00207454.2015.1025778 (2016).
- [0129] 4 McTigue, D. M. & Tripathi, R. B. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J. Neurochem.* **107**, 1-19, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x (2008).
- [0130] 5 Blakemore, W. F. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J. Neurocytol.* **1**, 413-426 (1972).
- [0131] 6 Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1-13 (1989).
- [0132] 7 Liu, Y. & Janeway, C. A., Jr. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int. Immunol.* **3**, 323-332 (1991).
- [0133] 8 Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991-1045 (1994).
- [0134] 9 Chen, G. Y. *et al.* Amelioration of sepsis by inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-시클렉G interaction. *Nat. Biotechnol.* **29**, 428-435, doi:nbt.1846 [pii] 10.1038/nbt.1846 (2011).
- [0135] 10 Chen, G. Y., Tang, J., Zheng, P. & Liu, Y. CD24 and 시클렉-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses. *Science* **323**, 1722-1725 (2009).
- [0136] 11 Fang, X., Zheng, P., Tang, J. & Liu, Y. CD24: from A to Z. *Cellular & molecular immunology* **7**, 100-103 (2010).
- [0137] 12 Bai, X. F. *et al.* CD24 Controls Expansion and Persistence of Autoreactive T Cells in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **200**, 447-458 (2004).
- [0138] 13 Zheng, C., Yin, S., Yang, Y., Yu, Y. & Xie, X. CD24 aggravates acute liver injury in autoimmune hepatitis by promoting IFN-gamma production by CD4+ T cells. *Cellular & molecular immunology*, doi:10.1038/cmi.2016.57 (2017).
- [0139] 14 Bai, X. F. *et al.* The heat-stable antigen determines pathogenicity of self-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* **105**, 1227-1232 (2000).

도면

도면1a

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**
NPTNATTKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면1b

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**
NPTNATTKVPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

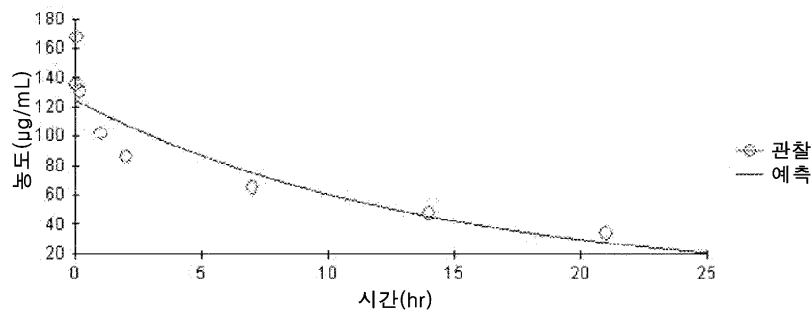
도면1c

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTNSGLAP**
NPTNATTKAPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

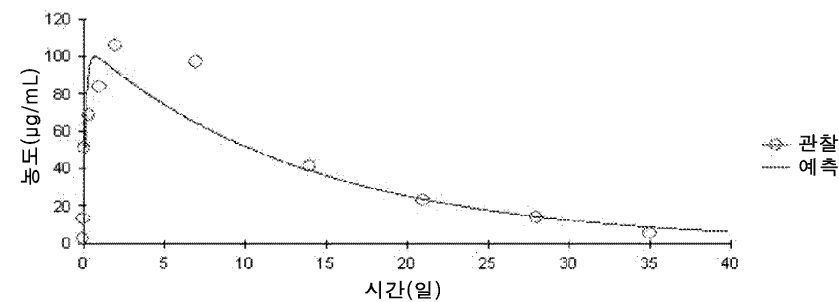
도면2

마우스 CD24 **NQTSVAPFPGN--QNI SAS----**PNP**TNATTRG**
 _* _ * * * *
 인간 CD24 **SETTTGTSS-NSSQSTNS**-GLAPNP**TNATTKA** (V)

도면3a



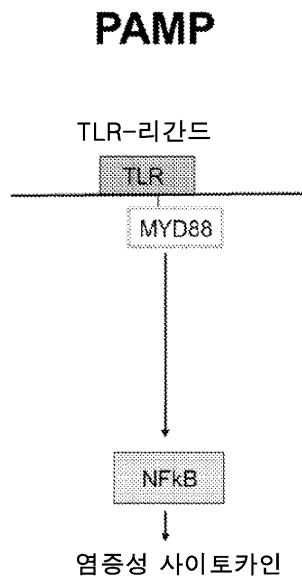
도면3b



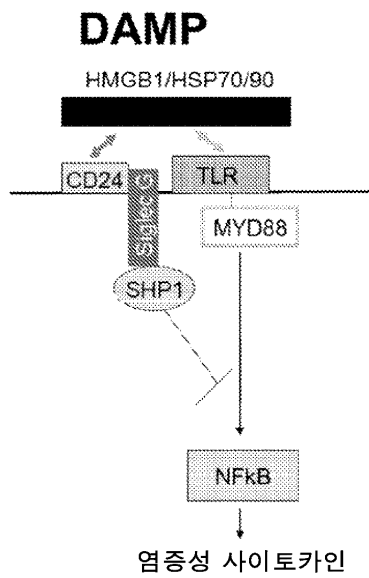
도면3c

경로	매개변수	단위	추정치	표준오차	CV%
i.v.	AUC	일*µg/mL	1709.5	305.2	17.85
s.c.			1453.2	181.4	12.49
i.v.	K10_HL	일	9.52	1.96	20.56
s.c.			9.54	1.43	14.97
i.v.	Cmax	ug/mL	124.4	10.3	8.31
s.c.			99.6	11.1	11.11

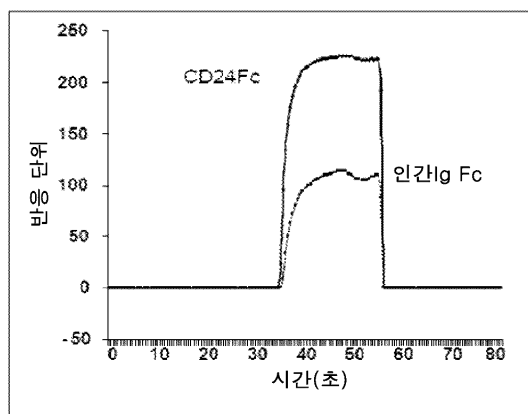
도면4a



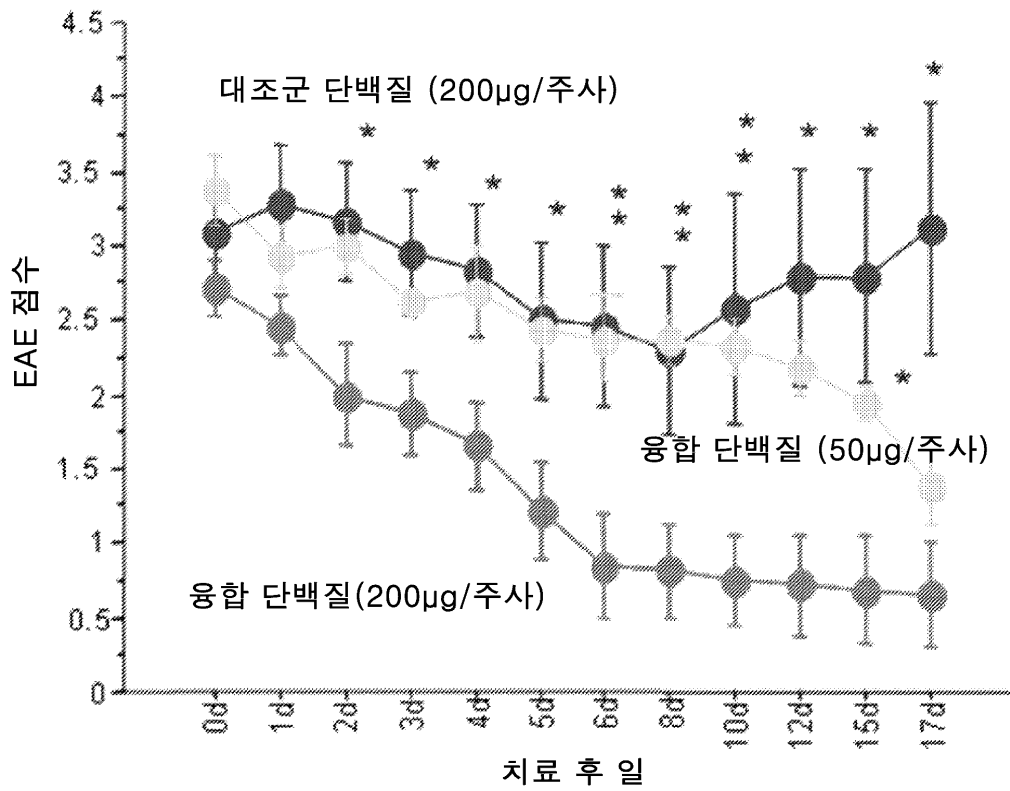
도면4b



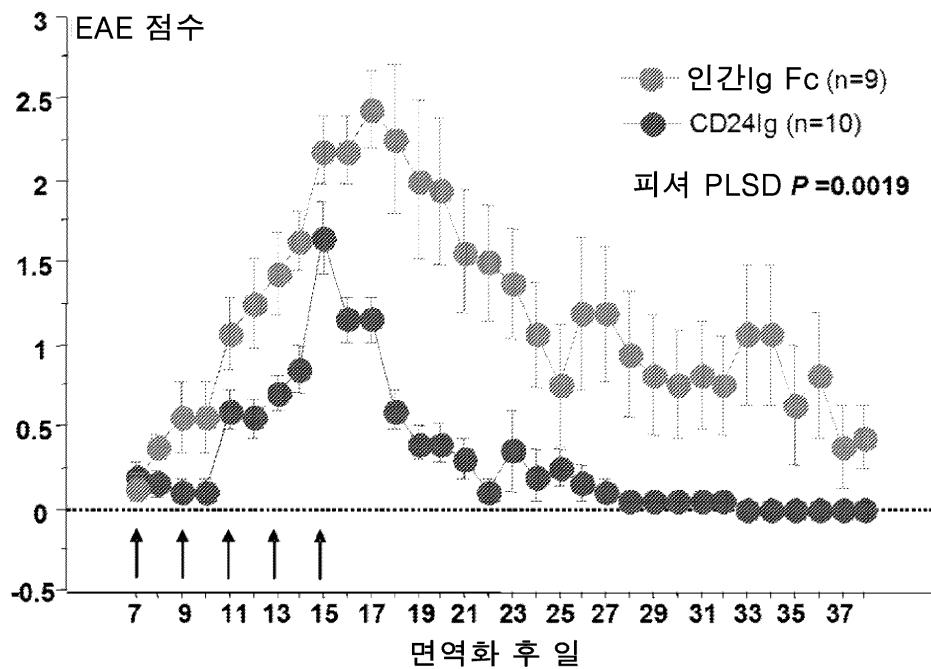
도면5



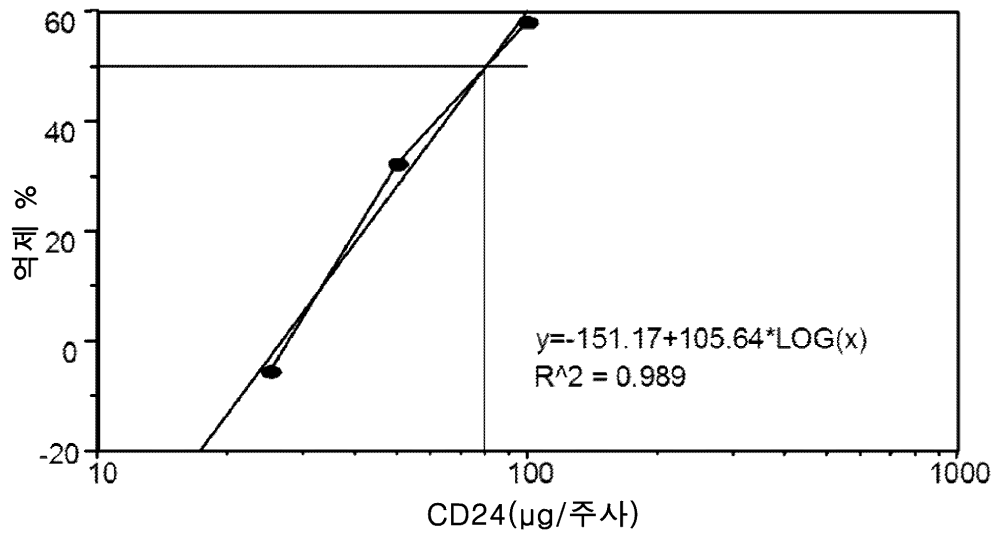
도면6



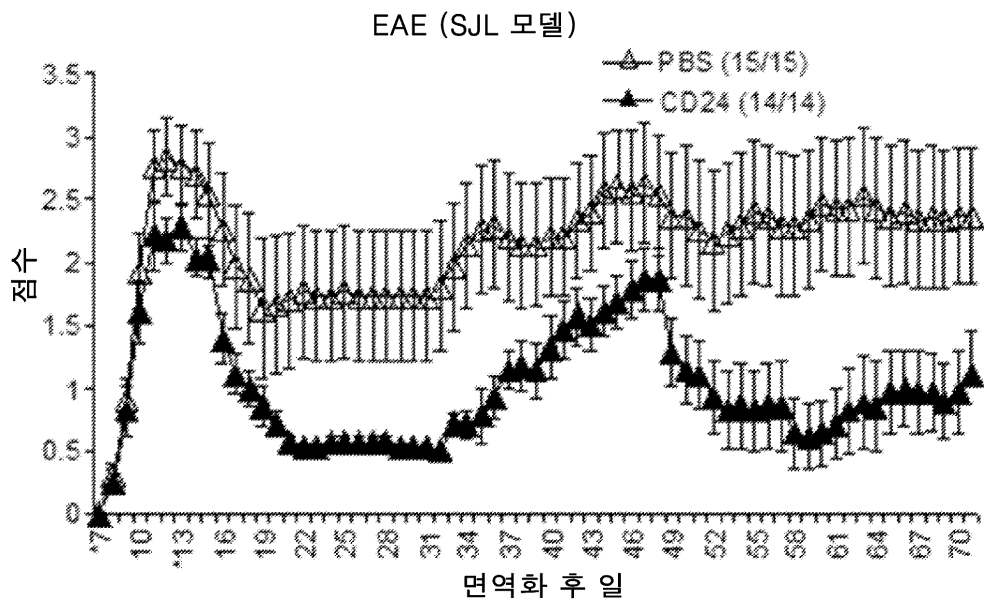
도면7



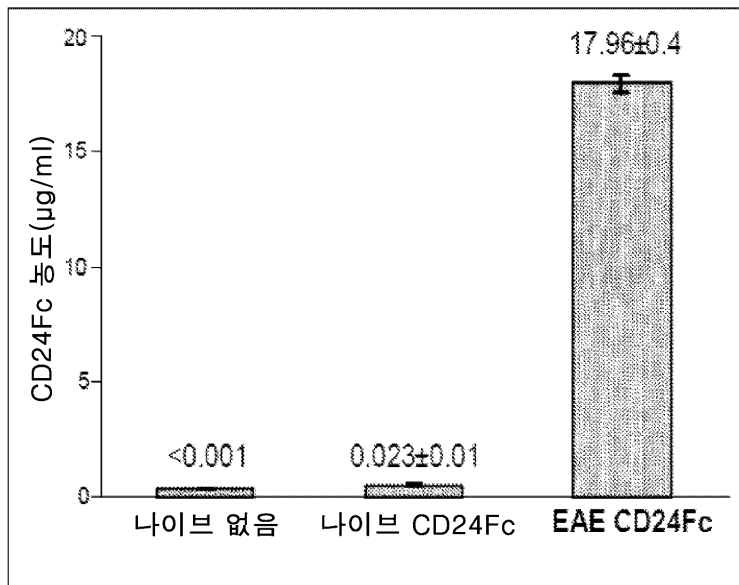
도면8



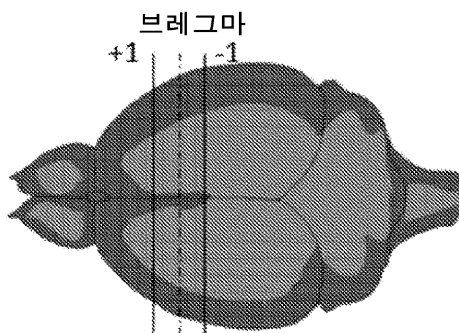
도면9



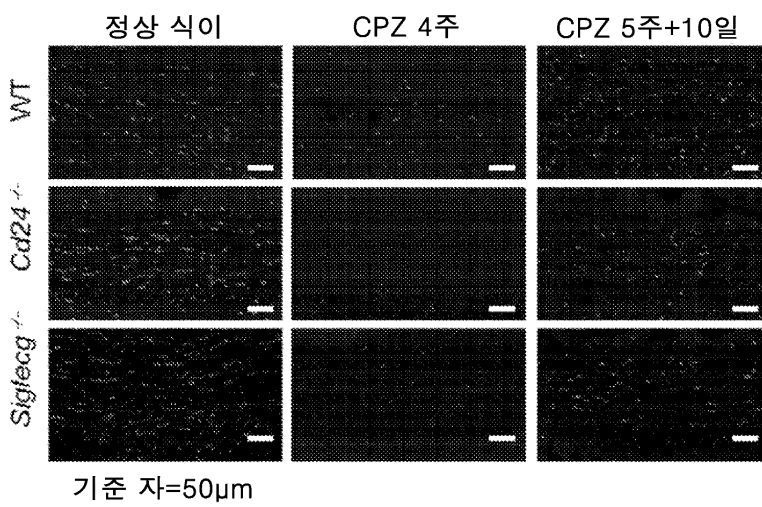
도면10



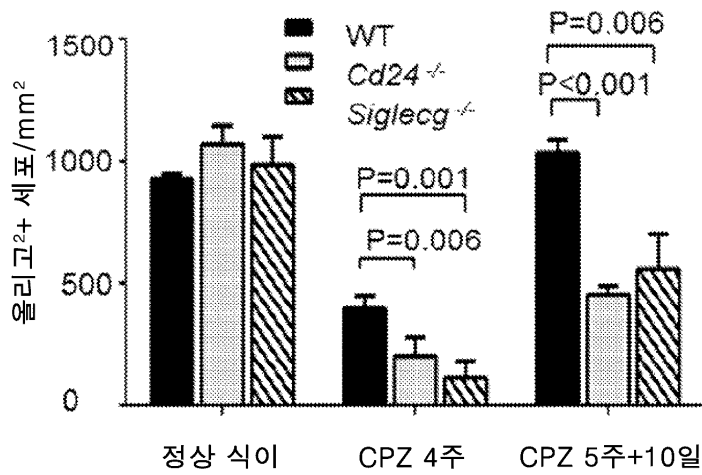
도면11a



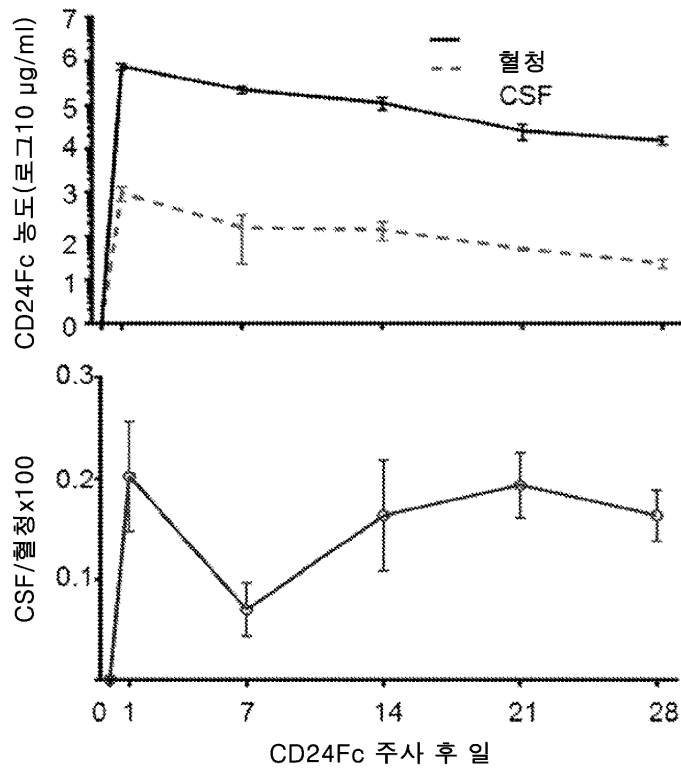
도면11b



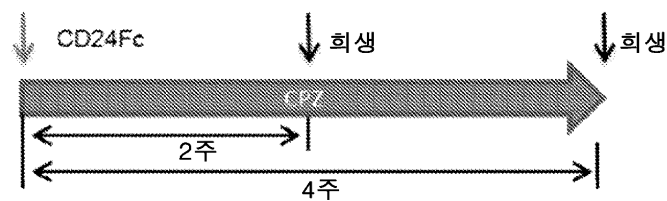
도면11c



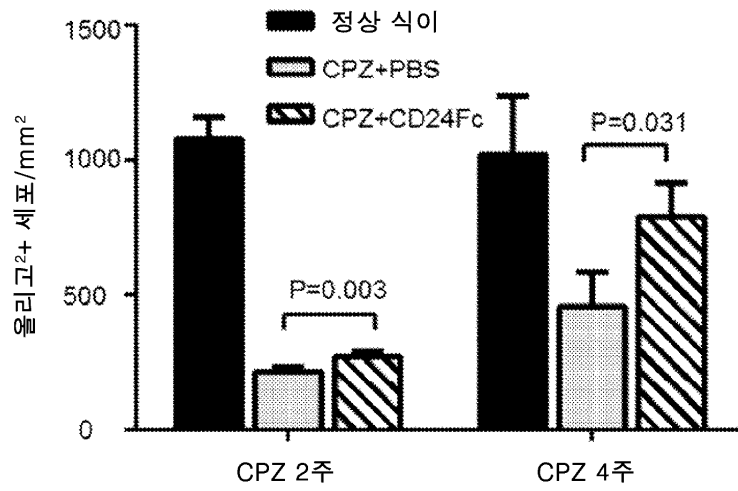
도면11d



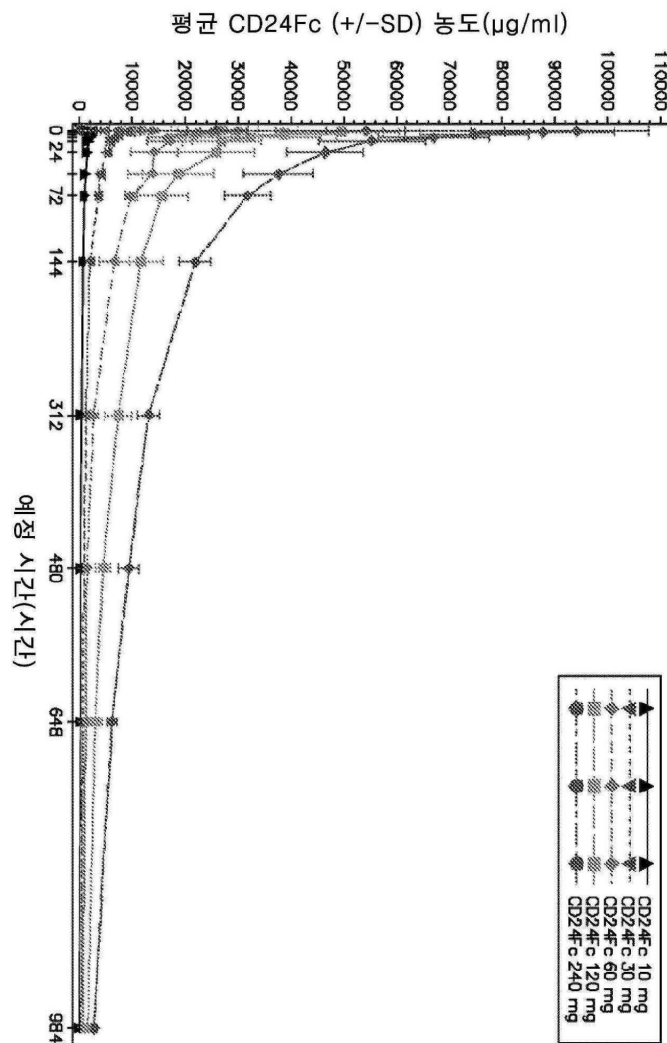
도면11e



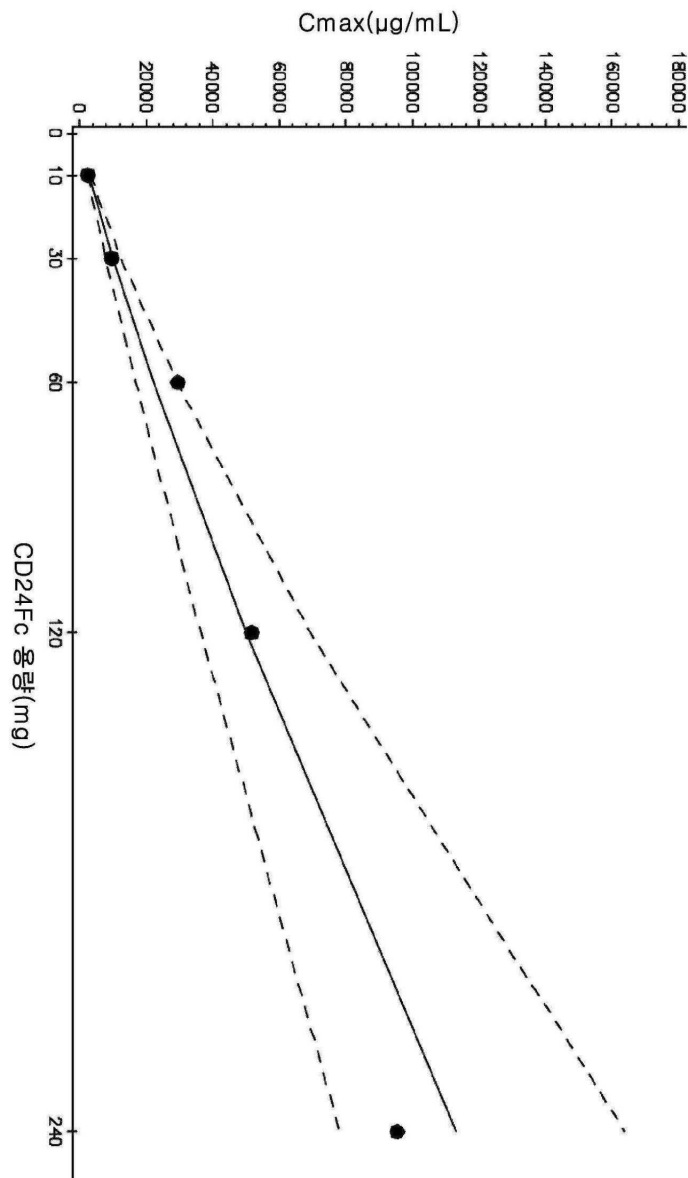
도면11f



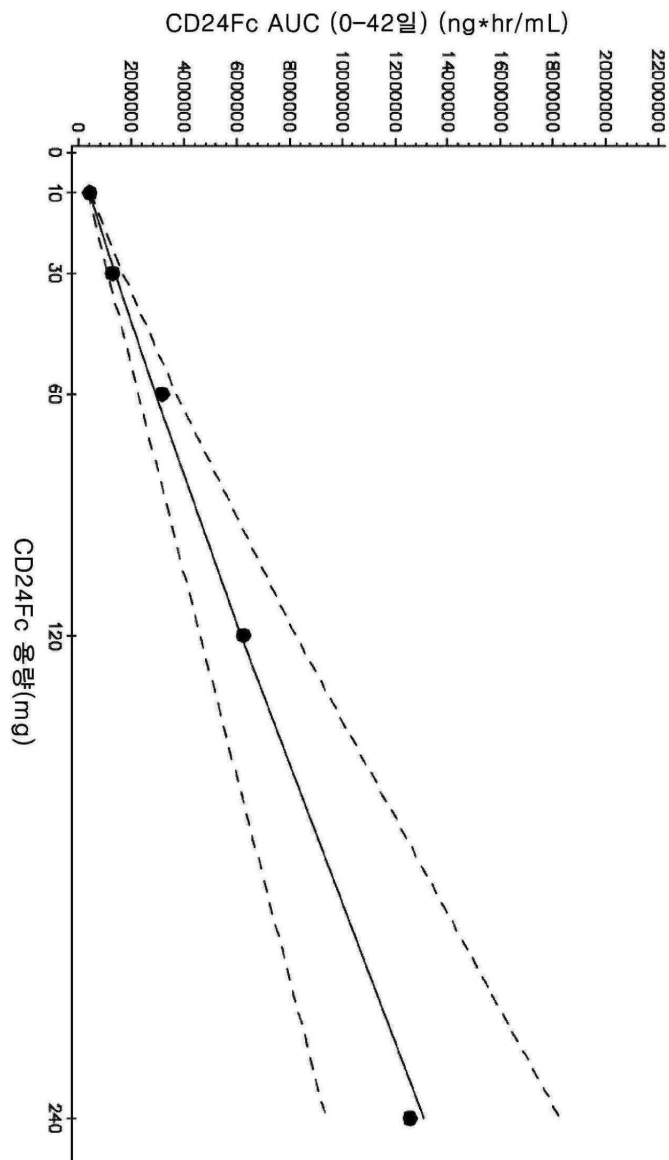
도면12



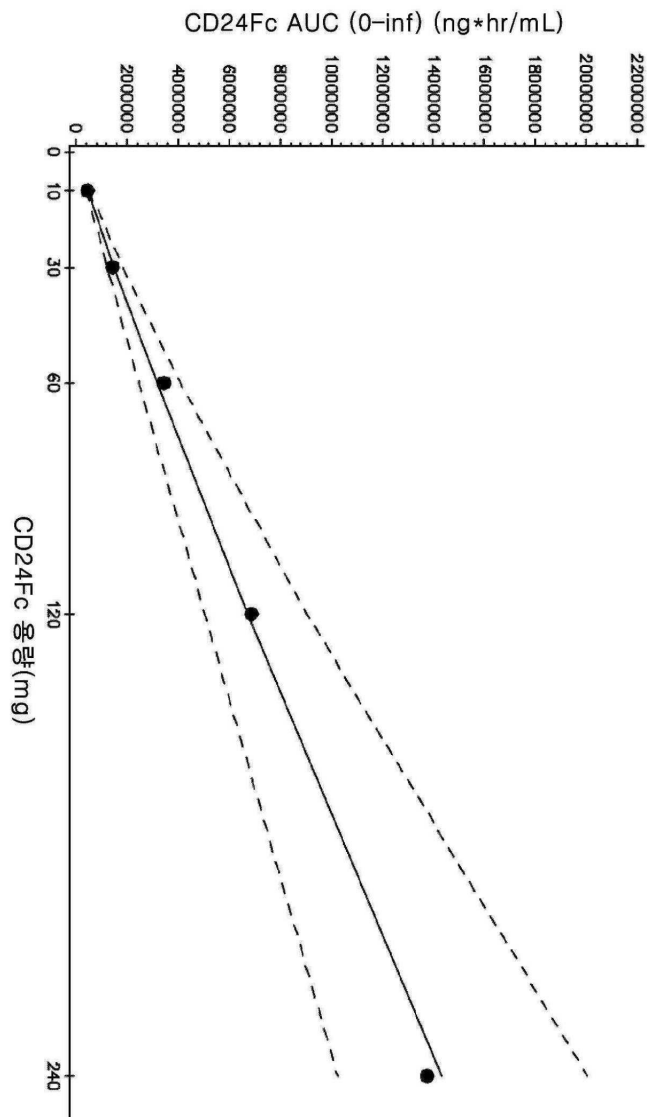
도면13



도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OncoImmune, Inc.

Children's National Medical Center

Liu, Yang

Zheng, Pan

Li, Ning

Devenport, Martin

<120> METHODS OF USE OF SOLUBLE CD24 FOR NEUROPROTECTION AND REMYELINATION

<130> 060275.0502.00USPZ

<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 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 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 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 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> 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

145 150 155 160

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 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 Lys 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 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 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 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 Lys 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> 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

[illegible]