



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102869369 B

(45) 授权公告日 2016.05.18

(21) 申请号 201180021423.6

CN 101254302 A, 2008.09.03,

(22) 申请日 2011.04.28

Sanchez e et al. Investigating the role of CD24 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. <Annals of the rheumatic diseases >. 2008, 1197-1198.

(30) 优先权数据

61/329,078 2010.04.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.10.29

审查员 黄蕊

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/034282 2011.04.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/139820 EN 2011.11.10

(73) 专利权人 肿瘤免疫股份有限公司

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 X. 郑 W. 吴 Y. 刘 P. 郑

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘蕾 沙捷

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(56) 对比文件

WO 01/072325 A1, 2100.11.04,

权利要求书1页 说明书13页

序列表4页 附图9页

(54) 发明名称

利用可溶性 CD24 治疗类风湿性关节炎的方法

(57) 摘要

本文提供了利用 CD24 蛋白质治疗类风湿性关节炎的方法。所述 CD24 蛋白质可包括成熟人或鼠 CD24 以及哺乳动物免疫球蛋白的 N-端或 C-端融合部分。

1. 一种 CD24 蛋白质,其中所述 CD24 蛋白质的序列由在 C 端与人 IgG1 蛋白的铰链区和 CH2 与 CH3 结构域相融合的成熟人 CD24 序列构成,该成熟人 CD24 序列由 SEQ ID NO:1 构成。

2. 如权利要求 1 所述的 CD24 蛋白质,其中所述 CD24 蛋白质是可溶的。

3. 如权利要求 1 所述的 CD24 蛋白质,其中所述 CD24 蛋白质是糖基化的。

4. 如权利要求 1 所述的 CD24 蛋白质,其中所述 CD24 蛋白质利用真核蛋白质表达系统生产。

5. 如权利要求 4 所述的 CD24 蛋白质,其中所述表达系统包括包含在中国仓鼠卵巢细胞系中的载体或复制缺陷逆转录病毒载体。

6. 如权利要求 5 所述的 CD24 蛋白质,其中所述复制缺陷逆转录病毒载体被稳定整合到真核细胞的基因组中。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的 CD24 蛋白质在制备用于治疗类风湿性关节炎的药物中的应用。

利用可溶性 CD24 治疗类风湿性关节炎的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求与 2010 年 4 月 28 日提交的美国临时专利申请号 61/329,078 的权益，其内容通过参考并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗类风湿性关节炎的组合物和方法。

背景技术

[0004] 本章节提供背景信息，其不必是现有技术，而且是对本公开内容的综合概述，该公开内容不是其全部范围或其所有特征的全面公开。

[0005] CD24 被称为耐热抗原 (1)。其表达为糖基磷脂酰肌醇 (GPI)- 锚定分子 (2)，并且在不同谱系中具有广泛的分布 (3)。由于 CD24 倾向于在未成熟细胞上表达，其也已经被用作部分干细胞标记物以及用于淋巴细胞分化。与 CD24 有关的第一功能是对抗原特异性 T 细胞反应的共刺激活性 (4-6)。体内试验表明，作为淋巴器官中 T 细胞激活的共刺激因子，CD24 是多余的，但是在缺乏 CD28 时其变成必要的 (7, 8)。这并不适合并非作为“共刺激因子富集的”的局部靶器官的情况。与这种概念一致，我们证明了具有 CD24 定向突变的小鼠完全抵抗实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的诱导 (9) (10)。

[0006] 人 CD24 的多态现象与数种自身免疫性疾病的风险和进展相关 (11-15)，包括多发性硬化症和类风湿性关节炎 (RA)。在多发性硬化症的情况中，我们已经报告了由鼠 CD24 和人 IgG1 Fc 的胞外部分组成的可溶性 CD24 改善实验性自身免疫性疾病多发性硬化症的鼠模型的临床症状 (9)。由我们中的一员进行的最近的研究表明，CD24 与危险相关分子模式 (DAMPs) 的宿主反应相互作用并对其抑制 (16)。

[0007] RA 影响 0.5-1% 的人口数量。尽管很多缓解疾病的抗风湿性药物 (DMARDs) 目前可用，但是根据美国风湿病学改善标准学会，即使生物学 DMARDs 的金标准，即靶向肿瘤坏死因子 α 的治疗法在小于 50% 的接受该治疗的患者中导致 50% 改善 (ACR50) (17)。不能达到对 RA 的治愈。因此，测试另外的 RA 治疗法的必要的。RA 被假定为关节中的自身免疫性疾病，尽管该疾病的病因很大程度上仍然不明。很多研究在类风湿性关节炎的发病机理中涉及 T 细胞 (18)。最近，已经显示，抗体转移能引发小鼠关节炎的发展 (19-21)。损伤病理学类似于人类类风湿性关节炎。

[0008] 从 RA 通过抗体的被动转移的研究中建立的最有趣的概念之一是：即使所述抗体无所不在被表达的蛋白质具有特异性，也能观察到组织特异性的自身免疫性疾病 (19-21)。这种概念是重要的，因为其表明，尽管具有共同的发病机理，不同器官 / 组织的自身免疫性疾病可能需要不同治疗。支持这种概念的是，广泛用于治疗多发性硬化症的干扰素 β 对治疗 RA 显示很小的效果 RA (22)。

[0009] 与人 RA 相关的动物模型对 DMARDs 方面治疗发展的进展起着重要作用。例如，在小鼠和大鼠中胶原诱导的关节病对开发 RA 治疗法是关键 (23)。最近，已经证实，抗胶原

抗体的适应性转移在小鼠中引发强烈的类似 RA 的损害 (19)。因为在疾病发作之前 RA 患者的自身抗体增加 (24, 25), 因此胶原特异性抗体的被动转移是人类 RA 的相关模型。

[0010] 因为 RA 的发病机理涉及对 DAMP 的宿主反应 (26, 27), 而且因为 CD24 分子负调节对 DAMP 的宿主反应 (16), 因此我们研究了利用可溶性 CD24 治疗 RA 的可能性。选择 RA 的被动转移模型, 原因在于其与人类疾病相关且实验设计简单。

发明内容

[0011] 本文提供了通过向需要其的哺乳动物施用 CD24 蛋白质而治疗类风湿性关节炎的方法。所述 CD24 蛋白质可包括成熟小鼠 CD24 或成熟人 CD24 的序列或其变体。成熟人 CD24 可由 SEQ ID NO:1 或 2 组成。成熟小鼠 CD24 可由 SEQ ID NO:3 序列组成。所述 CD24 蛋白质还可包括小鼠或人 CD24 的胞外域, 其可与成熟 CD24 的 N-端融合。CD24 的胞外域可由 SEQ ID NO:4 序列组成。所述 CD24 蛋白质还可包括一部分哺乳动物免疫球蛋白 (Ig), 其可与成熟 CD24 的 N-端或 C-端融合。所述 Ig 部分可以是人 Ig 蛋白质的 Fc 部分, 其可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或 IgA。该 Fc 部分可由人 Ig 蛋白质的铰链区和 CH2 与 CH3 结构域组成。所述 Fc 部分还可以由人 IgM 的铰链区和 CH3 与 CH4 结构域组合。

[0012] CD24 蛋白质可以是可溶性的, 而且可以是糖基化的。CD24 蛋白质可利用真核蛋白表达系统生产。该表达系统可包括包含在中国仓鼠卵巢细胞系中的载体或复制缺陷逆转录病毒载体。所述复制缺陷逆转录病毒载体可稳定地整合到真核细胞的基因组中。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1. CD24 融合蛋白 CD24IgG1Fc (SEQ ID NO:5) 的氨基酸组成。下划线的 26 个氨基酸是 CD24 的信号肽 (SEQ ID NO:4)。该序列的框住的黑体部分是融合蛋白中使用的成熟 CD24 蛋白质 (SEQ ID NO:1)。通常存在于成熟 CD24 蛋白质中的末尾氨基酸 (A 或 V) 已经从构建物中删除以避免免疫原性。非下划线的、非粗体的字母是包含铰链区和 CH1 与 CH2 结构域的 IgG1 Fc 序列 (SEQ ID NO:6)。

[0015] 图 2. 纯化和处理从哺乳动物细胞系表达的 CD24IgG1Fc 的方法。

[0016] 图 3. 来自小鼠的成熟 CD24 蛋白质 (SEQ ID NO:3) 与来自人的成熟 CD24 蛋白质 (SEQ ID NO:2) 之间的氨基酸序列变化。潜在糖基化位点被加粗, 其中 N-糖基化位点为红色。

[0017] 图 4. CD24Ig 对 RA 的治疗效果。使 8-10 周龄雄性 BALB/c 小鼠静脉内免疫接种 2mg/小鼠 ArthritoMab 诱导关节炎抗体鸡尾酒 (MDbioproducts, St Paul, MN)。2 天后, 对小鼠腹腔注射溶于 PBS 中的 9 μ g LPS。利用下述评分系统每日监控疾病发展。0, 无反应, 正常; 1, 轻微, 但明确的踝/腕发红及肿胀或者限于个别趾的表观发红和肿胀, 而不管受侵袭趾的数目; 2, 中度至严重的踝/腕发红及肿胀; 3, 整个手爪发红及肿胀; 4, 包括趾在内的四肢发炎最大化, 涉及多个关节。所显示的数据是来自四肢的合成分数 (平均值 +SE)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。两组之间的差异基于费雪 PLSD 测验也是显著的。

[0018] 图 5. CD24IgG1 的药物代谢动力学的 WinNonlin 区室模拟分析。开环代表 3 只小鼠的平均值, 线条是预期药物代谢动力学曲线, a. 静脉注射 1mg CD24IgG1。b. 皮下注射 1mg CD24IgG1。c. 比较如通过曲线下面积 (AUC)、半衰期和最大血液浓度测量的抗体总量。注意, 皮下注射的全部 AUC 和 C_{max} 是静脉注射的约 80%, 尽管该差异不是统计学上显著的。

[0019] 图 6. PAMP 与 DAMP 之间的 CD24-Siglec G(10) 相互作用鉴别。A. 对 PAMP 的宿主反应不受 CD24-Siglec G(10) 相互作用的影响。B. CD24-Siglec G(10) 相互作用抑制对 DAMP 的宿主反应,可能是通过 Siglec G/10- 结合的 SHP-1。

[0020] 图 7. A 单次注射 CD24Fc 降低 CAIA 的临床分数。a. 试验图标。BALB/c 小鼠 (8 周龄) 在第一天接受 mAbs 并结合载体或融合蛋白。在第三天对小鼠注射 LPS 并每日观察,连续 3 周, b. CD24Fc 降低 CAIA 的临床分数。在第一天注射一次融合蛋白 (1mg/ 小鼠) 或载体。双盲法测定临床分数。*, P<0.05 ;**, P<0.01 ;***, P<0.001。CD24 的效果在 6 个独立试验中再现,包括 PBS 组总计 52 只小鼠以及 CD24Fc 组总计 54 只小鼠。

[0021] 图 8. CD24Fc 降低关节中的炎性细胞因子和 CAIA 的水平。如在图 7a 中所图解引发和处理 CAIA。通过来自 BD pharmingen 的细胞因子小球微阵列测量炎性细胞因子。a. 代表性 FACS 曲线, b. 在关节匀浆中测量的减少的细胞因子 (平均值 +SE) 的概述。

[0022] 图 9. CD24Fc 减少关节中的炎症和软骨破坏。在第七天,从 CD24Fc 处理小鼠和对照小鼠中切下前爪和后爪,在 4% 多聚甲醛中固定 24 小时,之后用 5% 甲酸脱钙。然后将爪埋入石蜡中并用 H&E 和番红 O 红 (Sigma-Aldrich) 染色纵切面。

[0023] 图 10. 在 CAIA 诱导第五天施用的 CD24Fc 的治疗效果。将 CAIA- 诱导的小鼠随机分成两组,接受载体 (PBS) 或 CD24Fc。用双盲法为小鼠计分。显示了代表性的三个独立试验。

[0024] 图 11. 低剂量 CD24Fc 防止 CAIA 发展。a. 试验图, b. 关节炎的临床分数,双盲法计分。

[0025] 图 12. Siglecg 对于 CD24Fc 的治疗效果是基本的, WT(a) 和 Siglecg^{-/-} 小鼠 (b) 接受载体对照或 CD24Fc 并结合抗胶原 mAbs 的鸡尾酒。双盲法每天记录临床分数。

具体实施方式

[0026] 本发明人已经发现,可溶形式的 CD24 对治疗类风湿性关节炎非常有效。

[0027] 1. 定义

[0028] 本文使用的术语目的仅仅是描述特定实施方式,而非意图是限定性的。如在本说明书和所附权利要求中所述,单数形式“一个(a, an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另外清楚指示。

[0029] 关于本文中的数值范围描述,具有相同精确程度的其间的每个居间的数值明确考虑在内。例如,对于范围 6-9,除了 6 和 9 之外,数字 7 和 8 也考虑在内,而对于范围 6.0-7.0,数值 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 和 7.0 明确考虑在内。

[0030] “肽”或“多肽”是氨基酸的连接序列,并且可以是天然的、合成的,或者天然或合成的修饰体或组合。

[0031] “基本相同的”可指第一氨基酸序列和第二氨基酸序列在 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 或 300 个氨基酸的区域内至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同。

[0032] “治疗(treatment 或 treating)”当指防止动物免遭疾病时,意指预防、压制、抑制

或完全消除所述疾病。预防疾病包括在疾病发作之前向动物施用本发明的组合物。压制疾病包括在疾病引发之前但在其临床表现之前向动物施用本发明的组合物。抑制疾病包括在疾病临床表现之后向动物施用本发明的组合物。

[0033] “变体”可意指由于氨基酸的插入、缺失、或保守置换而使氨基酸序列不同但是保留至少一种生物活性的肽或多肽。“生物活性”的典型实例包括与 Toll-样受体结合以及被特异性抗体结合的能力。变体还可指其氨基酸序列与具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列的参考蛋白质基本相同的蛋白质。氨基酸的保守置换,即,氨基酸被类似性质(例如,亲水性、带电区的程度和分布)的不同氨基酸替换,在本领域被公认为典型涉及较小的变化。这些较小变化部分能通过考虑氨基酸的亲水性指数来鉴定,这在本领域是通晓的。Kyte 等, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982)。氨基酸的亲水性指数基于对其疏水性和电荷的考虑。本领域公知,类似亲水性指数的氨基酸可进行置换,但仍保留蛋白质功能。在一个方面,亲水性指数为 ± 2 的氨基酸被置换。氨基酸的亲水性还可用于显示将产生保留生物功能的蛋白质的置换。在肽的情况下考虑氨基酸的亲水性使得可计算该肽的最大局部平均亲水性,这是一种已经被报告与抗原性和免疫原性非常相关的有用的量度。美国专利号 4,554,101,其通过参考全部引入本文。具有类似亲水性值的氨基酸的置换可产生保留生物活性(例如,免疫原性)的肽,这在本领域是通晓的。置换可利用亲水性值在彼此的 ± 2 内的氨基酸进行。氨基酸的疏水性指数和亲水性值都受该氨基酸的特定侧链的影响。与该观察一致的是,应理解与生物功能相容的氨基酸置换取决于所述氨基酸相对近似性,特别是取决于那些氨基酸的侧链,如通过疏水性、亲水性、电荷、尺寸及其他性质所揭示的。

[0034] 2. CD24

[0035] 本文提供了 CD24 蛋白质,其具有成熟人 CD24 的氨基酸序列,该序列可以是 SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK (SEQ ID NO:1) 或 SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK (V/A) (SEQ ID NO:2),或者其具有小鼠 CD24 的氨基酸序列,该序列可以是 NQTSVAPFPGNQNISASPNTNATTRG (SEQ ID NO:3),或者其变体。所述 CD24 可以是可溶的。所述 CD24 还可包括 N-端信号肽,其可以具有氨基酸序列 MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS (SEQ ID NO:4)。该 CD24 还可具有如图 1 或 3 所述的氨基酸序列。该 CD24 可以以两种等位形式之一存在,以使成熟人 CD24 的 C-端氨基酸可以是缬氨酸或丙氨酸。C-缬氨酸或丙氨酸可能是免疫原性的而且可以从 CD24 中省去以降低其免疫原性。两种等位基因之间的差异可影响包括多发性硬化症和 RA 在内的自身免疫性疾病的风险。然而,因为这两种等位形式影响膜结合形式的表达水平,因此变异应当不影响 CD24 的功能。

[0036] 尽管来自小鼠和人的成熟 CD24 蛋白质的氨基酸序列的序列变化相当大,但是在与危险相关分子模式 (DAMP) 相互作用方面的它们的功能上是等价的。因为对 DAMP 的宿主反应被认为对 RA 的发病机理是重要的,因此小鼠和人 CD24 在治疗 RA 方面功能等价。作为小鼠与人 CD24 之间主要在 C-端和许多糖基化位点上的序列保守的结果,成熟 CD24 蛋白质的显著变化可耐受利用 CD24 治疗 RA,特别是如果这些变化不影响 C-端的保守残基或者不影响来自小鼠或人 CD24 的糖基化位点。

[0037] a. 融合

[0038] CD24 可在其 N-端或 C-端与部分哺乳动物 Ig 蛋白质(其可以是人或小鼠)融合。Fc 区域可包括 Ig 蛋白质的铰链区和 CH2 与 CH3 结构域。Ig 蛋白质可以是人 IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4、IgM 或 IgA。Fc 部分可以包括 SEQ ID NO:6。Ig 蛋白质还可以是 IgM,且 Fc 部分可以包括 IgM 的铰链区和 CH3 与 CH4 结构域。所述 CD24 还可在其 N-端或 C-端与蛋白质标记融合,该蛋白质标记可以是 GST、His 或 FLAG。制备融合蛋白质以及纯化融合蛋白质的方法在本领域是公知的。

[0039] b. 生产

[0040] CD24 可以是大量糖基化的,而且可以参与 CD24 的功能,诸如共刺激以及与危险相关分子模式相互作用。该 CD24 利用真核表达系统制备。该表达系统可需要从哺乳动物细胞中的载体表达,诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。该系统还可以是病毒载体,诸如复制缺陷逆转录病毒载体,其可用于感染真核细胞。CD 24 还可以从稳定的细胞系产生,该稳定的细胞系从已经被整合到细胞基因组中的载体或载体的一部分表达 CD24。所述稳定的细胞系可从整合的复制缺陷逆转录病毒载体表达 CD24。表达系统可以是 GPE_x (TM)。

[0041] 3. 治疗方法

[0042] 所述 CD24 可用于治疗类风湿性关节炎。该 CD24 可施用于需要其的对象。所述对象可以是哺乳动物诸如人。

[0043] a. 联合 CD24 治疗

[0044] 所述 CD24 可以另一种药物联合,诸如缓解疾病的抗风湿性药物 (DMARD)。所述药物可以是非类固醇抗炎药 (NSAID),其可以是丙酸衍生物、乙酸衍生物、烯醇酸衍生物、芬那酸 (fenamic acid) 衍生物或选择性 Cox2 抑制剂。所述药物还可以是皮质类固醇或甲氨喋呤。所述药物可以是生物类的,其可以是 TNF- α 拮抗剂,诸如抗 TNF- α 抗体或与 TNF- α 结合的融合蛋白 (Enbrel),抗 -CD20mAb,共刺激分子 CD80 和 CD86 的拮抗剂,诸如与这两个分子结合的单克隆抗体或融合蛋白 (CTLA4Ig),或者 IL-1 或 IL-6 受体的拮抗剂。CD24 和另一种药物可以一起或顺序施用。

[0045] b. 药物组合物

[0046] CD24 可以包含在药物组合物中,该药物组合物还可包含溶剂,其可使 CD24 长期间保持稳定。所述溶剂可以是 PBS,其可使 CD24 在 -20°C 稳定保持至少 36 个月。溶剂还能够适应 CD24 与另一种药物相结合。

[0047] c. 剂量

[0048] 用于人类的剂量最终可通过临床试验以测定具有可接受毒性和功效的剂量来确定。用于人类的初始临床剂量可通过在啮齿类和非人灵长类中的药物动力学和毒性研究来估计。CD24 的剂量可以是 0.01mg/kg 至 1000mg/Kg,并且可以是 1 至 500mg/kg,这取决于被治疗疾病的严重度和施用途径。

[0049] d. 施用

[0050] 药物组合物的施用途径可以是肠胃外的。肠胃外施用包括但不限于静脉、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鞘内、关节内和直接注射到受侵袭关节中。对于兽医应用,药物可以作为适当可接受的制剂按照正常的兽医实践来施用。兽医可容易地确定最适合特定动物的给药方案和施用途径。药物组合物可以施用于人类患者、猫、狗、大型动物或禽类。

[0051] CD24 可与其他治疗同时或有规律地 (metronomically) 施用。如本文所用的术语“同时的”或“同时地”意指 CD24 和其他治疗可在彼此的 48 小时内、优选 24 小时内、更优选 12 小时内、仍更优选 6 小时内以及最优选 3 小时或更少内施用。如本文所用的术语“有规

律地(metronomically)”意指药剂在不同于另一治疗的时间以及与重复施用相关的某一频率下施用。

[0052] CD24 可以在另一治疗之前的任何时刻施用,包括约 120 小时、118 小时、116 小时、114 小时、112 小时、110 小时、108 小时、106 小时、104 小时、102 小时、100 小时、98 小时、96 小时、94 小时、92 小时、90 小时、88 小时、86 小时、84 小时、82 小时、80 小时、78 小时、76 小时、74 小时、72 小时、70 小时、68 小时、66 小时、64 小时、62 小时、60 小时、58 小时、56 小时、54 小时、52 小时、50 小时、48 小时、46 小时、44 小时、42 小时、40 小时、38 小时、36 小时、34 小时、32 小时、30 小时、28 小时、26 小时、24 小时、22 小时、20 小时、18 小时、16 小时、14 小时、12 小时、10 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、55 分钟、50 分钟、45 分钟、40 分钟、35 分钟、30 分钟、25 分钟、20 分钟、15 分钟、10 分钟、9 分钟、8 分钟、7 分钟、6 分钟、5 分钟、4 分钟、3 分钟、2 分钟和 1 分钟。CD24 可以在第二 CD24 治疗之前的任何时刻施用,包括约 120 小时、118 小时、116 小时、114 小时、112 小时、110 小时、108 小时、106 小时、104 小时、102 小时、100 小时、98 小时、96 小时、94 小时、92 小时、90 小时、88 小时、86 小时、84 小时、82 小时、80 小时、78 小时、76 小时、74 小时、72 小时、70 小时、68 小时、66 小时、64 小时、62 小时、60 小时、58 小时、56 小时、54 小时、52 小时、50 小时、48 小时、46 小时、44 小时、42 小时、40 小时、38 小时、36 小时、34 小时、32 小时、30 小时、28 小时、26 小时、24 小时、22 小时、20 小时、18 小时、16 小时、14 小时、12 小时、10 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、55 分钟、50 分钟、45 分钟、40 分钟、35 分钟、30 分钟、25 分钟、20 分钟、15 分钟、10 分钟、9 分钟、8 分钟、7 分钟、6 分钟、5 分钟、4 分钟、3 分钟、2 分钟和 1 分钟

[0053] CD24 可在另一治疗之后的任何时刻施用,包括约 1 分钟、2 分钟、3 分钟、4 分钟、5 分钟、6 分钟、7 分钟、8 分钟、9 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟、40 分钟、45 分钟、50 分钟、55 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、6 小时、8 小时、10 小时、12 小时、14 小时、16 小时、18 小时、20 小时、22 小时、24 小时、26 小时、28 小时、30 小时、32 小时、34 小时、36 小时、38 小时、40 小时、42 小时、44 小时、46 小时、48 小时、50 小时、52 小时、54 小时、56 小时、58 小时、60 小时、62 小时、64 小时、66 小时、68 小时、70 小时、72 小时、74 小时、76 小时、78 小时、80 小时、82 小时、84 小时、86 小时、88 小时、90 小时、92 小时、94 小时、96 小时、98 小时、100 小时、102 小时、104 小时、106 小时、108 小时、110 小时、112 小时、114 小时、116 小时、118 小时和 120 小时。CD24 可在先前的 CD24 治疗之后的任何时刻施用,包括约 120 小时、118 小时、116 小时、114 小时、112 小时、110 小时、108 小时、106 小时、104 小时、102 小时、100 小时、98 小时、96 小时、94 小时、92 小时、90 小时、88 小时、86 小时、84 小时、82 小时、80 小时、78 小时、76 小时、74 小时、72 小时、70 小时、68 小时、66 小时、64 小时、62 小时、60 小时、58 小时、56 小时、54 小时、52 小时、50 小时、48 小时、46 小时、44 小时、42 小时、40 小时、38 小时、36 小时、34 小时、32 小时、30 小时、28 小时、26 小时、24 小时、22 小时、20 小时、18 小时、16 小时、14 小时、12 小时、10 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、55 分钟、50 分钟、45 分钟、40 分钟、35 分钟、30 分钟、25 分钟、20 分钟、15 分钟、10 分钟、9 分钟、8 分钟、7 分钟、6 分钟、5 分钟、4 分钟、3 分钟、2 分钟和 1 分钟。

[0054] 提供下述实施例来阐述本发明的方法,而且其绝不是限制所述方法的应用。

[0055] 实施例

[0056] 实施例 1

[0057] 可溶性 CD24 蛋白质

[0058] 将 CD24 的胞外域与 IgG1 Fc 融合。该 CD24 融合蛋白质的氨基酸组成在图 1 中提供。然后产生推动 CD24Ig 融合蛋白质表达的复制缺陷逆转录病毒。GPEx (TM) (基因产物表达的首字母缩写) 系统提供若干重要的优势, 其中最重要的一种就是平均起来 >1000 个插入 / 细胞, 但是每个插入仅 1 个拷贝。此外, 因为逆转录病毒优选插入转录活性基因座, 因此 GPExTM 产生高水平的靶蛋白表达。产生稳定的细胞系, 其生产高收率的 CD24Ig。另外, 生产 45g GLP 级产物和 ~100g cGMP 级产物。用于下游加工从生物反应器收获的培养基的方法总结在下面的流程图中 (图 2)。

[0059] 收获物澄清

[0060] 利用 Cuno 60M02 Maximizer 深度过滤器之后是 Millipore Opticap 0.22 μ m 过滤器, 澄清生物发言权培养基。将滤液收集到无菌收集袋中。通过 ELISA 获得样品的 CD24-Fc 收率测量。

[0061] 蛋白质 A 捕获

[0062] 使已澄清的培养基通过 A 蛋白树脂柱 (GE Healthcare MabSelect), 其浓度不超过 16g/L 树脂 (基于 ELISA), 且接触时间为 4 分钟。用平衡缓冲液 (50mM Tris+0.15M NaCl pH7.5), 然后用 10mM 柠檬酸钠 / 柠檬酸 pH 6.0 以 5 柱容 (cv) 洗涤该柱。已结合 CD24Ig 从柱中利用 10mM 柠檬酸钠 / 柠檬酸 pH 3.5 洗脱。

[0063] 病毒灭活

[0064] 通过添加 2M 盐酸, 使该蛋白 A 洗脱馏分立刻达到 pH 3.0, 并在环境温度下于该 pH 下保持 30 分钟。然后, 通过添加 1M Tris 碱使其达到 pH 5.0, 并利用 0.65 μ m 玻璃纤维过滤 (Sartorius Sartopure GF2) 过滤至澄清, 以及利用 0.2 μ m (Sartorius Sartopore 2) 过滤到无菌收集袋中。

[0065] SP-Sepharose 色谱法

[0066] 将病毒灭活材料应用于 SP-Sepharose 柱 (GE Healthcare), 其浓度不不超过 25g/L 树脂 (基于 A280nm, 1.22=1mg/mL), 以及线性流速为 250cm/hr。用平衡缓冲液 (10mM 柠檬酸钠 / 柠檬酸 pH 5.0) 洗涤该柱, 并利用 10mM 柠檬酸钠 / 柠檬酸 +0.2M NaCl pH5.0 从柱中洗脱出已结合 CD24Ig。将流出物收集到无菌收集袋中。

[0067] Mustang Q 色谱法

[0068] 通过添加 1M Tris 碱将 SP-Sepharose 洗脱物调节到 pH 7.5 并利用 WFI 稀释以降低电导率。将稀释的物质应用于 Mustang Q 过滤器 (Pa11), 其浓度不超过 0.5g/L 树脂 (基于 A280nm, 1.22=1mg/mL), 且流速为 5 柱体积 / 分钟。用平衡缓冲液 (10mM Tris pH 7.5) 洗涤该过滤器, CD24-Fc 包含在穿流 (flow through) 中且被收集到无菌收集袋中。

[0069] 病毒过滤

[0070] 然后在 30psi 恒压下使 Mustang Q 穿流经过 0.2 μ m 过滤器和 Millipore NFP 病毒过滤器 (标称孔径 20nm) 过滤, 并收集到无菌收集袋中。

[0071] 浓缩和最终配制

[0072] 浓缩产物并利用 10kDa 超滤性膜 (Millipore Prep/Scale) 以约 10mg/mL 的终浓度 (如通过 280nm 下的吸光度所测) 滤过到 10mM 磷酸钠、150mM 氯化钠 pH 7.2 中。从同时位于生物安全厨中的批量中抽取分析样品。进行标记, 并将样品递送至 QC 进行测试, 同时

将批量的等分试样贮存在 2-8°C 等待释放 (pending release)。

[0073] 病毒清除率研究

[0074] 在 Cardinal Health, NC 在于 CHM 制备的样品上进行病毒清除验证。来自 Gala Biotech 的有资质的科学家在 Cardinal Health Viral Validation 实验室在 Cardinal 卫生人员的协助下进行色谱和过滤步骤。自 200L 规模过程展开按比例缩减的步骤。选择两种病毒用于该研究。第一种是嗜异性鼠白血病病毒 (XMuLv), 其是一种来自逆转录病毒科家族的大小为 80-130nm 的包膜 RNA 病毒。第二种是猪细小病毒 (PPV), 其是一种大小为 18-26nm 的非包膜 DNA 病。这被认为是一种强壮病毒, 并且预期相比 XMuLv 通过提纯方案会展示低得多的病毒减少。

[0075] 实施例 2

[0076] 利用 CD24Fc 治疗 RA

[0077] 该实施例显示 CD24 可用于治疗 RA。因为在基本发作之前抗胶原抗体存在于 RA 患者中, 而且因为该抗胶原抗体能够在小鼠中诱导 RA- 样病理学, 因此利用已建立的 RA 被动转移模型来测试可溶性 CD24 的功效。将融合蛋白质以 10mg/ml 溶于 PBS 载体中。如在图 4 中所示, 4 种抗胶原抗体组合在所有四肢中引起严重的临床症状, 这在载体和 CD24Fc 处理组中均于第 7 天达到顶峰。所述疾病的特征在于所有四肢中的整个爪发红及肿胀。一些四肢最大程度发炎, 包括趾和多个关节。因此, 该可溶性蛋白质不影响所述疾病的开始。惊人的是, CD24Fc 处理组显示出迅速得多的康复。临床分数的下降在第 9 天开始是非常显著的, 并最后持续整个 24 天的观察期。因此, CD24Fc 提供有效的 RA 治疗。有趣的是, 因为这种效果想是该病高峰之后观察到的, 因此, 很可能是阻断 CD24 影响炎症开始之后的慢性疾病过程。

[0078] 实施例 3

[0079] CD24 药物动力学

[0080] 将 1mg CD24IgG1 注射到幼稚 C57BL/6 小鼠中, 并在不同时间点收集血样 (5 分钟、1 小时、4 小时、24 小时、48 小时、第 7 天、第 14 天和第 21 天), 其中每个时间点 3 只小鼠。稀释血清 1:100, 并利用夹心酶联免疫分析利用纯化的抗人 CD24 (3.3 μ g/ml) 作为捕获抗体以及过氧化物酶缀合的羊抗 - 人 IgG Fc (5 μ g/ml) 作为检测抗体检测 CD24Ig 的水平。如在图 5a 中所示, CD24Ig 的衰减曲线显示出典型的蛋白质双相衰减。第一个生物扰动相具有 12.4 小鼠的半衰期。第二相遵从来自中央区室的一级消除模型。第二相的半衰期是 9.54 天, 其类似于抗体的体内半衰期。这些数据表明, 所示融合蛋白质在血流中非常稳定。在融合蛋白质被皮下注射的另一研究中, 观察到几乎相同的 9.52 天的半衰期 (图 5b)。更重要的是, 尽管 CD24Ig 在血液中达到峰值水平需要约 48 小时, 但是血液中融合蛋白质的总量 (如通过 AUC 所测量的) 对于任一种注射途径而言基本相同。因此, 从治疗的观点而言, 不同的注射途径应当不影响药物的治疗效果。该观察极大简化了灵长类毒性和临床试验的试验设计。

[0081] 实施例 4

[0082] 用于治疗 RA 的 CD24

[0083] 数十年来, 一直假定 RA 主要是 T- 细胞介导的自身免疫性疾病。在最近二十年, 在抗体以及 B 淋巴细胞在 RA 发病机理中可能起到的作用再度觉醒。因此, 除类风湿因子之

外,在 RA 患者中已经发现自体反应抗体的宿主,尽管其在人类中还未被最终阐明鉴别。然而,若干证据系已经证实,在小鼠模型中,对无所不在或组织特异性抗原具有特异性的抗体足以引发 RA 症状。例如,发现来自 K/BxN TCR 转基因小鼠的抗体在新宿主中完全能够转移类似 RA 的疾病。同样,4 种抗胶原抗体的鸡尾酒(混合物)现在广泛用于在小鼠中诱发 RA。该模型现在被称为 CAIA,即胶原抗体诱导的关节炎。

[0084] 对 CAIA 模型的遗传分析表明了补体的关键作用。尽管其他可能性存在,但是这些需求表明在 RA 的发病机理中潜在涉及抗体介导的组织损害。组织损害与炎症之间的关联在免疫学中是一种长期的观察。几乎二十年以前,Matzinger 提出通常被称为危险理论的说法。大体上,她指出,当免疫系统在宿主中感觉到危险时其就会打开。尽管危险的性质在当时未被充分定义,但是已经确定,坏死与胞内成分诸如的 HMGB1 和热休克蛋白的释放相关,其被称为 DAMP,即危险相关分子模式。发现 DAMP 促进炎症细胞因子和自身免疫性疾病的产生。在动物模型中,发现 HMGB1 和 HSP90 的抑制剂可改善 RA。DAMP 的参与唤起了如下的前景:针对对 DAMP 的宿主反应的负调节可用于 RA 治疗。CD24-Siglec 10 在对组织损害的宿主反应中相互作用。

[0085] 利用扑热息痛引发的肝坏死并确保炎症,我们观察到通过相互作用, Siglec G, CD24 对组织损害的宿主反应提供负调节。CD24 是 GPI 锚定的分子,其在造血细胞和其他组织肝细胞中广泛表达。对人中的多种自身免疫性疾病(包括多发性硬化症、全身性红斑狼疮、RA 和巨大细胞关节炎)的遗传分析显示在 CD24 多态现象与自身免疫性疾病的风险之间有着显著关联。Siglec G 是 I-凝集素家族成员,其通过其识别含唾液酸的结构来定义。Siglec G 识别 CD24 上含唾液酸的结构并且通过树突状细胞负调节炎症细胞因子的产生(16)。就其与 CD24 相互作用的能力而言,人 Siglec 10 和小鼠 Siglec G 在功能上是等价的。然而,不清楚是否存在在小鼠和人同源物之间是否存在一对一的对应。尽管机理仍需得到完整的解释,但是好似合理的是, SiglecG- 相关的 SHP1 可能参与负调节。最近在 Science 中报告的这些数据导致一个新模型,在该模型中,CD24-Siglec G/10 相互作用在识别病原体相关的分子模式(PAMP)与 DAMP 上可能起着关键作用(图 6)。

[0086] 至少两种重叠的机理可解释 CD24 的功能。首先,通过与多种 DAMP 结合,CD24 可捕捉炎症刺激物,以防止它们与 TLR 或 RAGE 相互作用。这种概念通过下述观察而得到支持:即,CD24 与包括 HSP70、90、HMGB1 和核仁素在内的数种 DAMP 分子缔合。第二,可能在与 DAMP 缔合之后,CD24 可通过 Siglec G 刺激信号传导。两张机理可能一致地起作用,因为具有任一种基因的定向突变的小鼠发动了强得多的炎症应答。实际上,从来自 CD24^{-/-} 或 Siglec G^{-/-} 小鼠的骨髓培养的 DC 当用 HMGB1、HSP70 或 HSP90 刺激上产生高得多的炎症细胞因子。相反,在其对 PAMP (诸如 LPS 和 PolyLC.) 的反应中没有发现效果。这些数据不仅提供了先天免疫系统区分病原体与组织损害的机理,而且表明 CD24 和 Siglec G 可作为针对与组织损害相关的疾病的潜在治疗靶标。

[0087] CD24Fc 对胶原-抗体诱导的关节炎的治疗作用

[0088] 考虑到在 RA 发病机理中对组织损害的先天免疫的疑似作用,以及在负调节此类反应方面 CD24-Siglec G/10 途径的作用,研究了刺激这种途径以治疗 RA 的可能性。基本上所有自身免疫学疾病的发病机理涉及诱导对自体抗原和自身免疫性破坏的免疫反应。自身免疫性破坏阶段集中在、基于 CD24-Siglec G 相互作用的新功能。因此,对于初步分析,

采用胶原抗体诱导的关节炎来评价潜在的治疗效果。

[0089] 如图 7a 所示,通过在第 1 天以 2mg/小鼠静脉内注射四种抗胶原 mAbs(MD Biosciences, St. Paul, MN),以及在第 3 天腹腔内注射 100 μ g/小鼠 LPS(MD Bioscience),在 8 周龄 BALB/c 小鼠上诱导 CAIA。在第 1 天用 1mg CD24Fc 或等体积的 1xPBS 载体作为负对照处理小鼠。如图 7b 所示,与载体对照相比,CD24Fc 提供非常显著的治疗效果。

[0090] 为理解 CD24Fc 在该模型中藉此降低关节炎的机理,从 CD24Fc 处理小鼠或 PBS 对照组的匀浆关节中测量细胞因子,以及通过细胞因子小球微阵列测量 200 μ g 组织匀浆的上清液。典型的实例示于图 8a 中,而概括数据示于图 8b 中。这些数据证明,全身施用的 CD24 降低可包括 TNF- α 、IL-6、MCP-1(CCL2) 和 IL-1 β 在内的多种炎性细胞因子的水平。

[0091] CD24Fc 的效果通过 CAIA 小鼠的滑膜关节的组织学分析得以证实,如在图 9 中所呈现的。在第 7 天,在关节炎诱导之后,H&E 染色证实 PBS 组中的关节滑膜被包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞在内的炎性细胞严重侵袭(图 9a)。这在 CD24Fc 处理小鼠中要低得多(图 9b)。另外,通过在 PBS- 处理(图 9c)小鼠中番红 O 红色染色损失暴露出严重的关节损害,但在 CD24Fc- 处理组中未发生(图 9d)。

[0092] 为确定小鼠 CD24Fc 对进行中的 RA 是否具有治疗效果,在 RA 诱导后第 5 或 7 天开始处理。如图 10 所示,在快速 CD24Fc 处理之后两天观察到 RA 评分显著降低。即使没有附加的处理,治疗效果在剩下的观察期一直持续。这些数据还增强了 CD24Fc 对进行中疾病的治疗潜力。

[0093] 为了评价 CD24Fc 在人类中的治疗剂量,通过很大反应的剂量来滴定测量 CD24Fc。如图 11 所示,少达 2 微克/小鼠足以具有统计学显著的治疗效果。

[0094] CD24Fc 的 Siglecg- 依赖性治疗效果

[0095] 为测定 CD24Fc 通过与 Siglec G 相互作用是否保护小鼠,我们测定了治疗效果是否依赖于 Siglecg 基因。因为 Siglecg- 缺乏型小鼠利用来自 C57BL/6 小鼠的 ES 细胞产生,我们采用 WT C57BL/6 小鼠作为对照。如图 12 所示,因为 B 小鼠已知对 CAIA 较不敏感,因此总疾病分数低于在 BALB/c 小鼠中所观察到的。然而,单次注射 CD24Fc 基本消除了 WT 小鼠中的临床症状。重要的是,即使疾病在 Siglecg- 缺乏型小鼠中不太严重,但是 CD24Fc 没有治疗效果。因此,CD24Fc 的治疗效果严格依赖于 Siglecg 基因。

[0096] 总言之,本文所述的数据证实了 CD24Fc 对 CAIA 具有很高的治疗效果。鉴于我们在安全性、稳定性方面的大量数据以及我们成功地制造出 CD24Fc,所有这些都表明所述融合蛋白质作为 RA 治疗剂的巨大潜力。

[0097] 实施例 5

[0098] 毒性

[0099] 对啮齿类和非人类灵长类的广泛毒性研究已经显示,在小鼠和非人类灵长类中 12.5 至 125mg/g 的剂量没有药物相关的毒性。

[0100] 所引用的参考文献

[0101] 1. Springer, T., G. Galfré, D. S. Secher, and C. Milstein. 1978. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol* 8:539-551.

[0102] 2. Pierres, M., P. Naquet, J. Barbet, S. Marchetto, I. Maries, C. Devaux, M.

Barad, R. Hyman, and G. Rougon. 1987. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J1 Id is attached to aglycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Eur J Immunol* 17:1781-1785.

[0103] 3. Rougon, G., L. A. Alterman, K. Dennis, X. J. Guo, and C. Kinnon. 1991. The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hematolymphoid and neural cell lineages. *Eur J Immunol* 21:1397-1402.

[0104] 4. Liu, Y., and C. A. J. Janeway. 1992. Cells that present both specific ligand and the costimulatory activity are the most efficient inducer of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3845-3849.

[0105] 5. Liu, Y., B. Jones, A. Aruffo, K. M. Sullivan, P. S. Linsley, and C. A. Janeway, Jr. 1992. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 175:437-445.

[0106] 6. Liu, Y., B. Jones, W. Brady, C. A. Janeway, Jr., P. S. Linsley, and P. S. Linsley. 1992. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1993 Mar; 23(3):780]. *Eur J Immunol* 22:2855-2859.

[0107] 7. Liu, Y., R. H. Wenger, M. Zhao, and P. J. Nielsen. 1997. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185:251-262.

[0108] 8. Wu, Y., Q. Zhou, P. Zheng, and Y. Liu. 1998. CD28-independent induction of T helper cells and immunoglobulin class switches requires costimulation by the heat-stable antigen. *J Exp Med* 187:1151-1156.

[0109] 9. Bai, X. F., J. Q. Liu, X. Liu, Y. Guo, K. Cox, J. Wen, P. Zheng, and Y. Liu. 2000. The heat-stable antigen determines pathogenicity of self-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105:1227-1232.

[0110] 10. Bai, X. F., O. Li, Q. Zhou, H. Zhang, P. S. Joshi, X. Zheng, Y. Liu, Y. Wang, and P. Zheng. 2004. CD24 Controls Expansion and Persistence of Autoreactive T Cells in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* 200:447-458.

[0111] 11. Otaegui, D., A. Saenz, P. Camano, L. Blazquez, M. Goicoechea, J. Ruiz-Martinez, J. Olaskoaga, J. A. Emparanza, and A. Lopez de Munain. 2006. CD24 V/V is an allele associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Spanish population. *Mult Scler* 12:511-514.

[0112] 12. Rueda, B., J. A. Miranda-Filloo, J. Martin, and M. A. Gonzalez-Gay. 2008. Association of CD24 gene polymorphisms with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 35:850-854.

[0113] 13. Sanchez, E., A. K. Abelson, J. M. Sabio, M. A. Gonzalez-Gay, N. Ortego-Centeno, J. Jimenez-Alonso, E. de Ramon, J. Sanchez-Roman, M. A. Lopez-Nevot, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, G. Sturfelt, L. Truedsson, A. Jonsen, M.

F. Gonzalez-Escribano, T. Witte, M. E. Alarcon-Riquelme, and J. Martin. 2007. Association of a CD24 genepolymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56:3080-3086.

[0114] 14. Wang, L. , S. Lin, K. Rammohan, Z. Liu, J. Liu, R. -H. Liu, N. Guinther, Q. Zhou, T. Wang, X. Zheng, D. J. Birmingham, B. H. Rovin, L. A. Herbert, Y. Wu, D. J. Lynn, G. Cooke, C. Y. Yu, P. Zheng, and Y. Liu. 2007. A di-nucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *Plos Genetics* 3:e49.

[0115] 15. Zhou, Q. , K. Rammohan, S. Lin, N. Robinson, O. Li, X. Liu, X. F. Bai, L. Yin, B. Scarberry, P. Du, M. You, K. Guan, P. Zheng, and Y. Liu. 2003. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiplesclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15041-15046.

[0116] 16. Chen, G. Y. , J. Tang, P. Zheng, and Y. Liu. 2009. CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses. *Science* 323:1722-1725.

[0117] 17. Wiens, A. , R. Venson, C. J. Correr, M. F. Otuki, and R. Pontarolo. Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacotherapy* 30:339-353.

[0118] 18. Panayi, G. S. , J. S. Lanchbury, and G. H. Kingsley. 1992. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35:729-735.

[0119] 19. Banda, N. K. , J. M. Thurman, D. Kraus, A. Wood, M. C. Carroll, W. P. Arend, and V. M. Holers. 2006. Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 177:1904-1912.

[0120] 20. Korganow, A. S. , H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, R. Pelanda, T. Martin, C. Degott, H. Kikutani, K. Rajewsky, J. L. Pasquali, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10:451-461.

[0121] 21. Maccioni, M. , G. Zeder-Lutz, H. Huang, C. Ebel, P. Gerber, J. Hergueux, P. Marchal, V. Duchatelle, C. Degott, M. van Regenmortel, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195:1071-1077.

[0122] 22. van Holten, J. , K. Pavelka, J. Vencovsky, H. Stahl, B. Rozman, M. Genovese, A. J. Kivitz, J. Alvaro, G. Nuki, D. E. Furst, G. Herrero-Beaumont, L. B. McInnes, P. Musikic, and P. P. Tak. 2005. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64:64-69.

[0123] 23. Vilcek, J. , and M. Feldmann. 2004. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in pharmacological sciences* 25:201-209.

- [0124] 24. Rantapaa-Dahlqvist, S., B. A. de Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U. Sundin, and W. J. van Venrooij. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2741-2749.
- [0125] 25. van Venrooij, W. J., and G. J. Pruijn. 2000. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis research* 2:249-251.
- [0126] 26. Jiang, W., and D. S. Pisetsky. 2007. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Nature clinical practice* 3:52-58.
- [0127] 27. van Beijnum, J. R., W. A. Buurman, and A. W. Griffioen. 2008. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 11:91-99.
- [0128] 28. Sanchez, E., B. Fernandez-Gutierrez, M. A. Gonzalez-Gay, A. Balsa, A. Garcia, L. Rodriguez, D. Pascual-Salcedo, M. F. Gonzalez-Escribano, and J. Martin. 2008. Investigating the role of CD24 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:1197-1198.
- [0129] 29. Kay, R., P. M. Rosten, and R. K. Humphries. 1991. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 147:1412-1416.
- [0130] 30. Kay, R., F. Takei, and R. K. Humphries. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J Immunol* 145:1952-1959.
- [0131] 31. Motari, E., X. Zheng, X. Su, Y. Liu, M. Kvaratskhelia, M. Freitas, and P. G. Wang. 2009. Analysis of Recombinant CD24 Glycans by MALDI-TOF-MS Reveals Prevalence of Sialyl-T Antigen. *American journal of biomedical sciences* 1:1-11.
- [0132] 32. Liu, Y. 1994. *The costimulatory pathway for T cell response*. RGLandes, Austin.

[0001]

序 列 表

<110> 肿瘤免疫股份有限公司

<120> 利用可溶性 CD24 治疗类风湿性关节炎的方法

<130> 060275.0400.01PC00

<150> 61/329,078

<151> 2010-04-28

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys
 20 25 30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> Xaa

<222> (31)..(31)

<223> Val 或 Ala

<400> 2

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Xaa
 20 25 30

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> 小鼠

[0002]

<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> 人

<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> 人工序列

<220>

<223> 人 CD24 IgG1 Fc 融合蛋白

<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

[0003]

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
115 120 125

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
130 135 140

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
145 150 155 160

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
165 170 175

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
180 185 190

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
210 215 220

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
245 250 255

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 6

<211> 231

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

[0004]

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

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSSETTTGTSSNSSQSSTSNGLAF
NFTNATTKPNSGDKHTCPFCAPPELLGGEVFLFPFSPKDTLMISRT
PEVTGVVVDVSHEDPEVKENWYVDSVEVNEANTNPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHDDWLNCKEYKCKVSNKALPAPFKTISKAKCQFNEPQVYTLF
PSRDELTRNQVSLTCLVNGFYPSDLAVEMESNGQPENNYKTIFFVLDS
DGSEFLYSKLIVDKSRWQQGNVEFCVVMHEALRNHYTQKSLQLSPGK

图 1

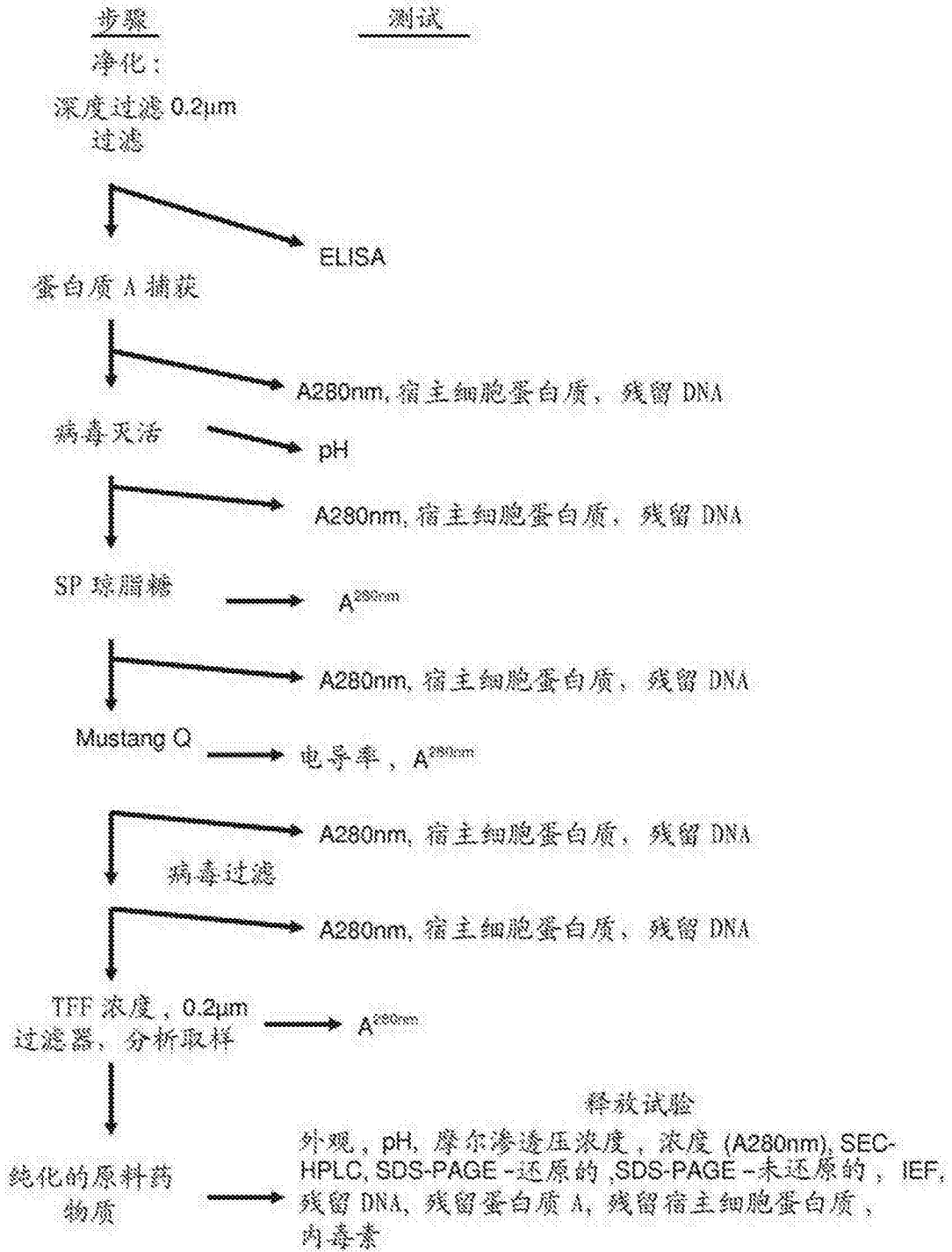


图 2

小鼠 cd24	NQTSVAPFPGN--QNISAS----	PNPNTNATTRG
	_* _ * * *	*****_
人 CD24	SETTTGTSS-NSSQSTNS-	GLAPNPTNATTKA (V)

图 3

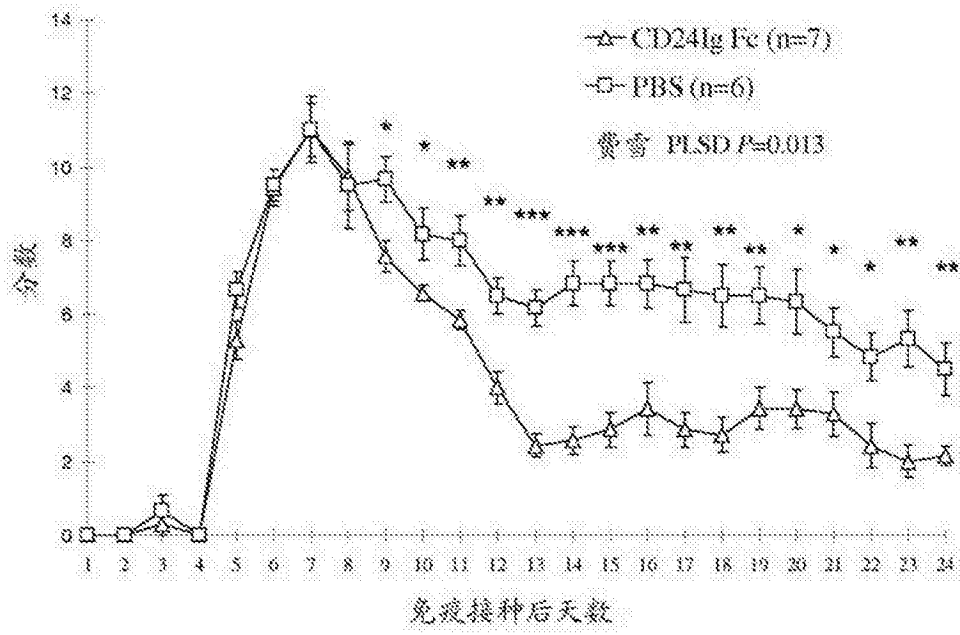


图 4

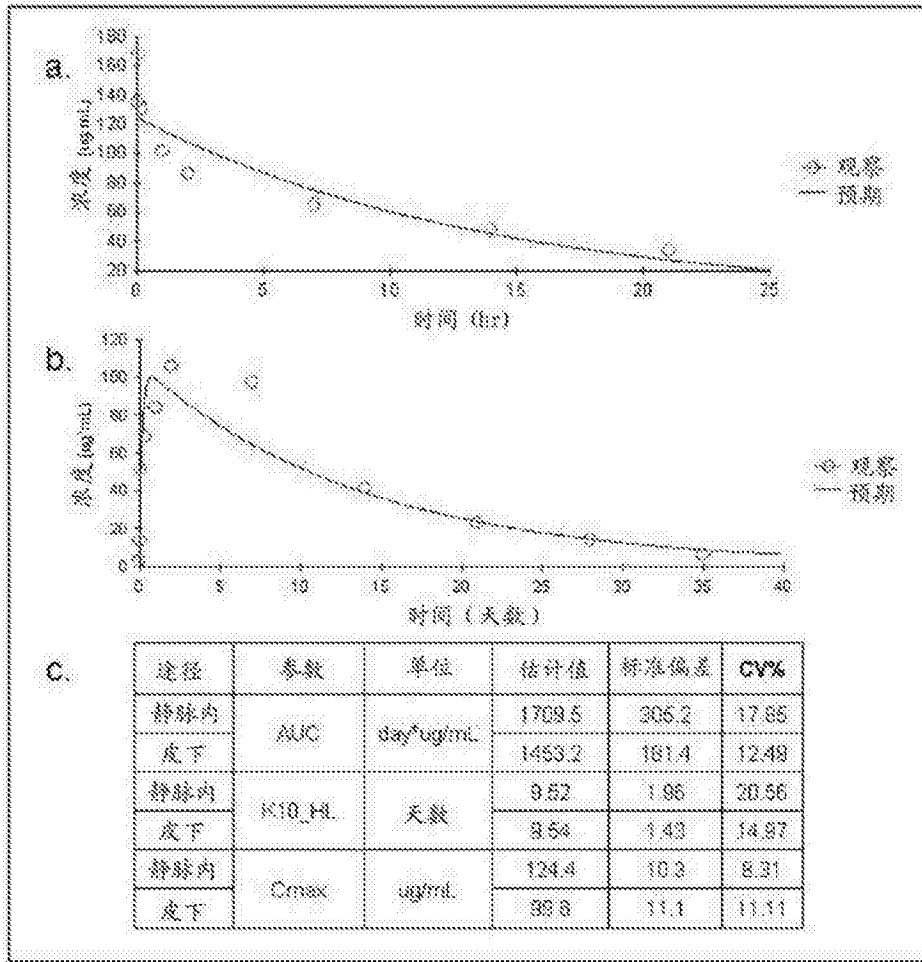


图 5

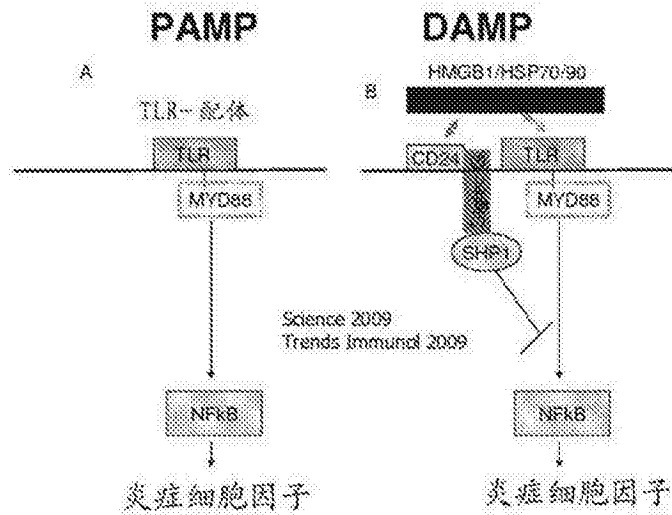


图 6

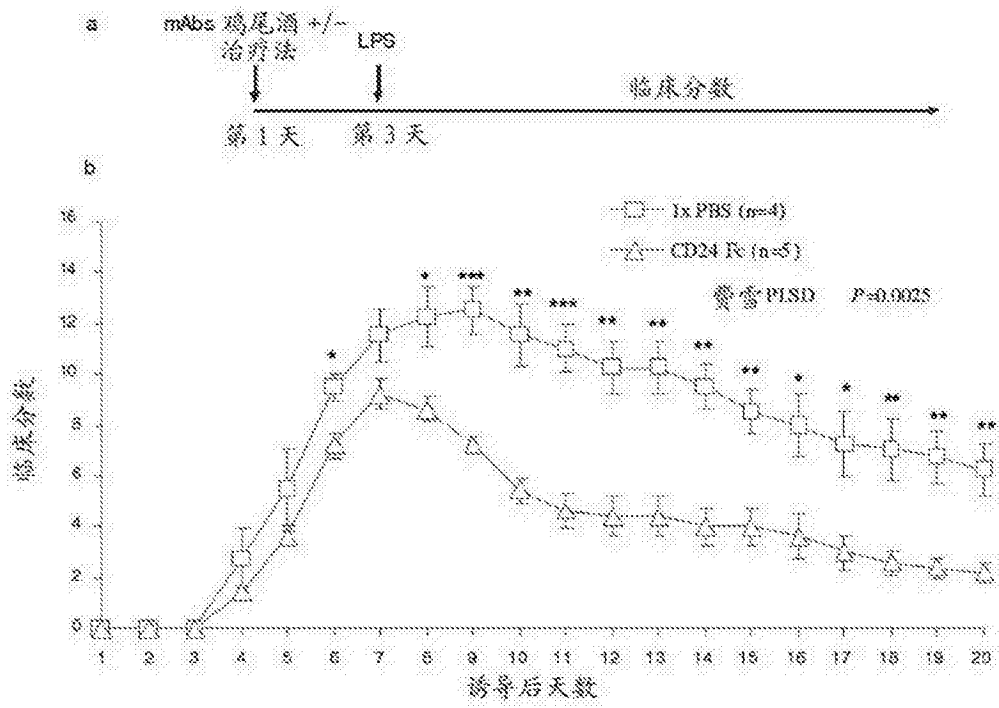


图 7

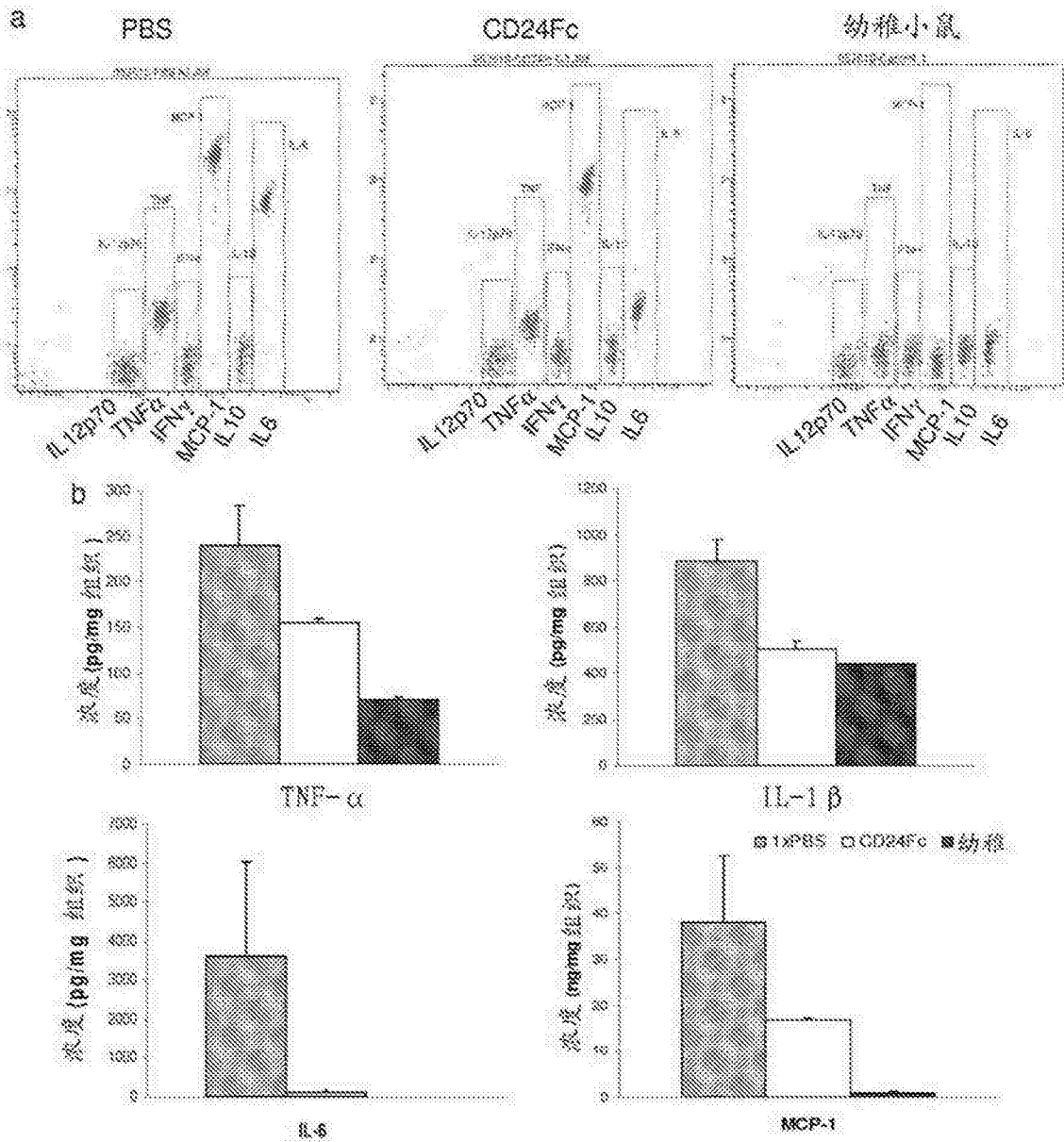


图 8

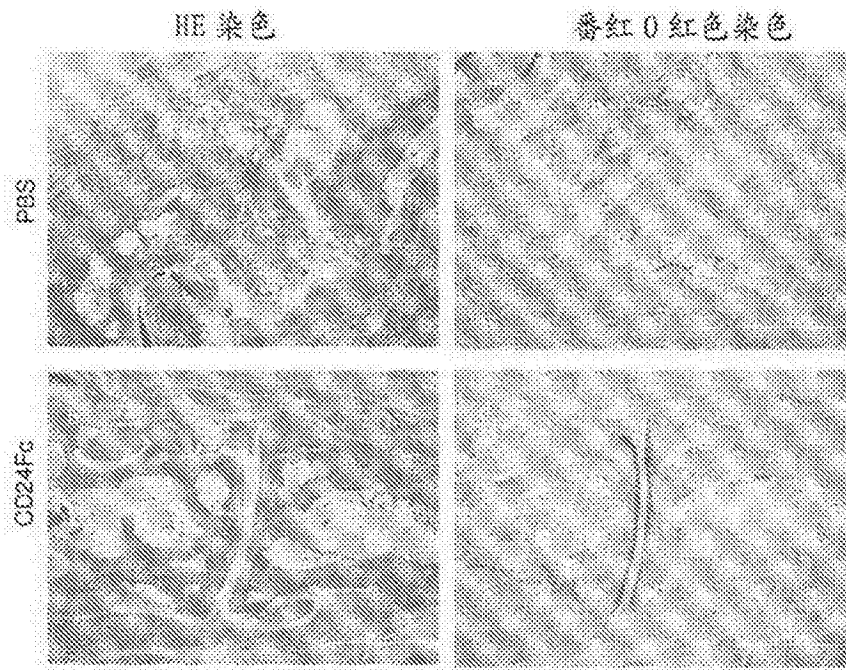


图 9

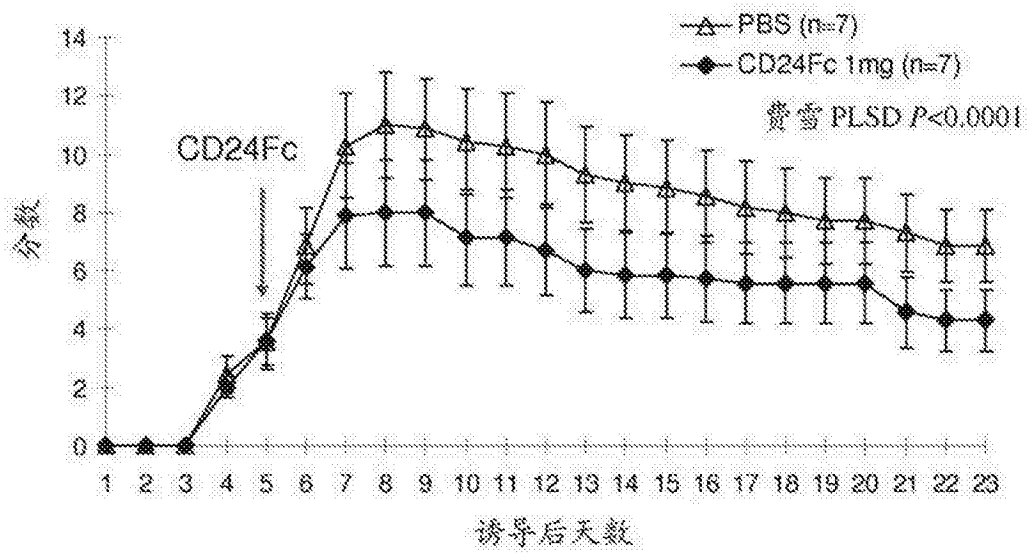


图 10

CD24Fc 的剂量依赖性治疗效果

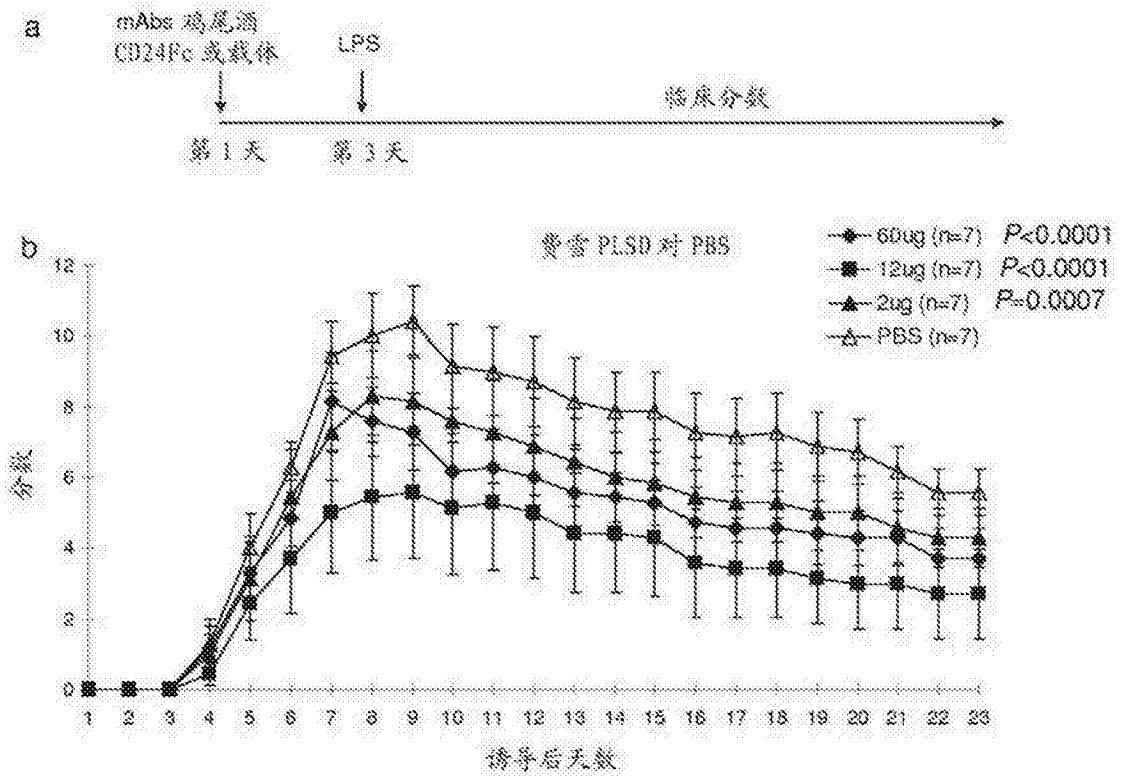


图 11

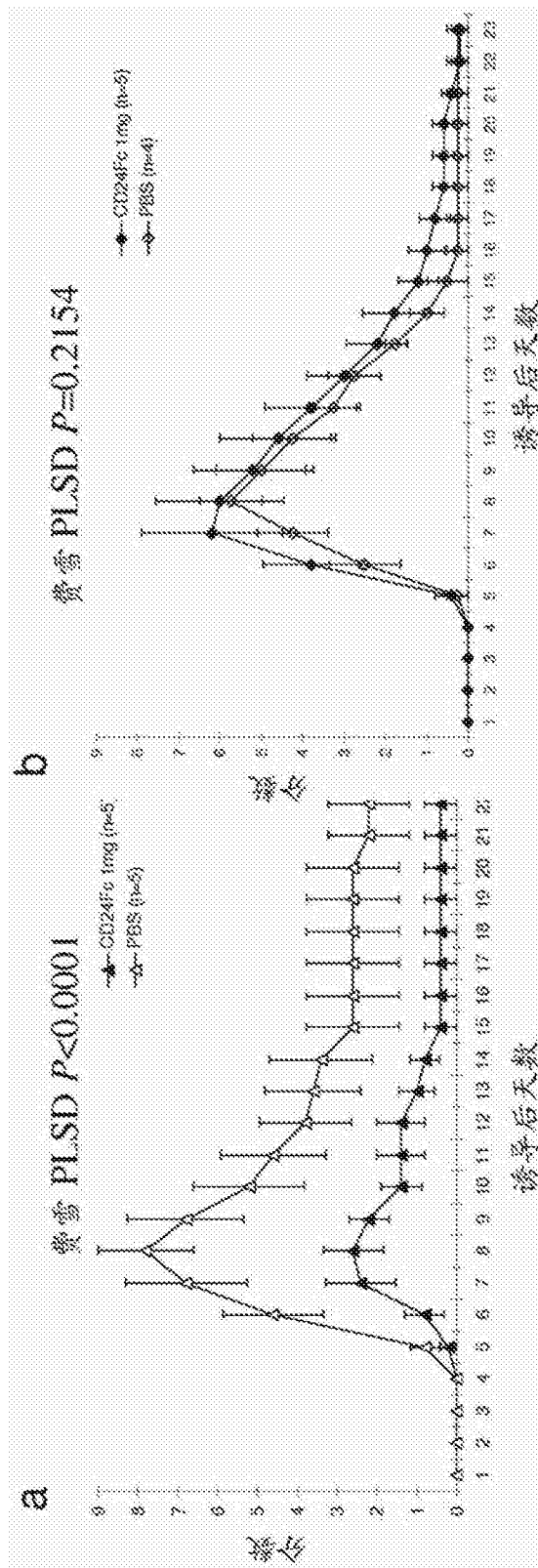


图 12