

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036805**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.23**

**(21)** Номер заявки  
**201790538**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.04.28**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/435** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54) БЕЛОК CD24 ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ТКАНИ, ОПОСРЕДОВАННОГО DAMP**

---

**(31)** 61/329,078

**(32)** 2010.04.28

**(33)** US

**(43)** 2017.07.31

**(62)** 201290961; 2011.04.28

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОНКОИММЬОН, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Чжэн Синьчэн, У Вэй, Лю Ян, Чжэн  
Пань (US)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Котов И.О., Буре Н.Н.,  
Стойко Г.В. (RU)**

**(56)** US-A1-20030095966  
CHEN Guo-Yun et al. CD24 and Siglec-10  
selective repress tissue damage-induced immune  
responses. Science, 2009 March 27; 323(5922):  
1722-1725, doi:10.1126/science.1168988,p.1-12  
US-A1-20050214290  
BAI Xue-Feng et al. The heat-stable antigen  
determines pathogenicity of self-reactive T cells  
in experimental autoimmune encephalomyelitis. The  
Journal of Clinical Investigation, May 2000, Vol. 105,  
no. 9, p.1227-1232

---

**(57)** Предложен белок CD24 для подавления ответа хозяина на молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP) у субъекта, где аминокислотная последовательность белка CD24 состоит из зрелого полипептида CD24 человека, слитого с Fc фрагментом белка иммуноглобулина человека (Ig), где последовательность зрелого полипептида CD24 человека состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 и где белок CD24 не содержит аланина или валина в положении, непосредственно C-терминальном по отношению к SEQ ID NO: 1.

---

**B1**

**036805**

**036805**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Данный документ заявляет приоритет по первоначальной заявке США US 61/329,078, поданной 28 апреля 2010, которая включена в данный документ во всей полноте путем ссылки.

### **Область техники**

Изобретение относится к белку CD24 для подавления ответа хозяина на молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP), у субъекта.

### **Предшествующий уровень техники**

Этот раздел содержит информацию, которая необязательно является уровнем техники, и краткое описание настоящего изобретения, которое не является раскрытием его в полном объеме или всех его признаков.

CD24 известен как устойчивый к нагреванию антиген (1). Он экспрессируется как гликозил-фосфатидил-инозитол (ГФИ)-якорная молекула (2) и имеет широкое распространение в различных клеточных путях (3). Благодаря тенденции CD24 экспрессироваться на незрелых клетках, он используется также как часть маркеров стволовых клеток и для дифференцировки лимфоцитов. Первой функцией, связанной с CD24, является со-стимулирующая активность (совместная) для антиген-специфического ответа Т-клеток (4-6). Изучение *in vivo* показало, что как со-стимулятор для активации Т-клеток в лимфоидных органах, CD24 избыточен, но он становится необходимым в отсутствие CD28 (7, 8). Это не будет происходить в случае локальных органов-мишеней, которые не так "богаты со-стимулятором". В соответствии с этим понятием авторы изобретения показали, что мыши с целевой мутацией CD24 полностью устойчивы к индуцированию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) (9) (10).

Полиморфизмы CD24 человека связаны с риском и развитием серьезных аутоиммунных заболеваний (11-15), включающих множественный склероз и ревматоидный артрит (РА). В случаях множественного склероза авторы изобретения сообщали, что растворимый CD24, состоящий из внеклеточной части CD24 мыши и IgG1 Fc человека, улучшает клинический симптом экспериментальных аутоиммунных заболеваний, модель рассеянного склероза на мышах (9). Более поздние исследования одного из авторов изобретения показали, что CD24 взаимодействует и подавляет ответ хозяина на молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP) (16).

РА поражает 0,5-1% населения. Хотя в настоящее время существует ряд облегчающих заболевание антиревматических лекарств (DMARD), но даже "золотой стандарт" биологических DMARD, лекарственные средства, нацеленные на фактор некроза опухоли-альфа, приводят к 50% улучшению в соответствии с Критериями Улучшения Американского Колледжа Ревматологии (АКР50) менее чем у 50% пациентов, получающих такое лечение (17). Не существует лечения для РА. Таким образом, необходимо тестировать дополнительные варианты терапии для РА. Предполагается, что РА является аутоиммунным заболеванием суставов, хотя причины заболевания остаются в значительной степени неясными. Ряд исследований вовлекают Т-клетки в патогенез ревматоидного артрита (18). Недавно было показано, что перенос антител может вызвать развитие воспаления суставов у мышей (19-21). Патология поврежденных напоминает ревматоидный артрит человека.

Одной из наиболее интересных концепций, установленных в ходе исследований с пассивным переносом РА с помощью антител, является то, что могут наблюдаться тканеспецифичные аутоиммунные заболевания, даже если антитела специфичны для белков, которые экспрессируются везде (19-21). Это замечание важно, поскольку оно предполагает, что, несмотря на общий патогенез, аутоиммунные заболевания различных органов/тканей могут требовать различного лечения. В поддержку этого замечания, интерферон бета, который широко используется для лечения рассеянного склероза, показывает слабый эффект при лечении РА (22).

Модели на животных, относящиеся к РА человека, играют важную роль для улучшения развития терапии с DMARD. Например, индуцированный коллагеном артрит у мышей и крыс был критичен для развития лекарственных средств для РА (23). Недавно было показано, что адаптивный перенос анти-коллагеновых антител вызывает сильное РА-подобное поражение у мышей (19). Так как содержание антител повышено у РА пациентов перед началом заболевания (24, 25), пассивный перенос коллаген-специфических антител является соответствующей моделью для РА у людей.

Так как патогенез РА включает ответ хозяина на DAMP (26, 27) и так как молекула CD24 негативно регулирует ответ хозяина на DAMP (16), авторы изобретения исследовали возможность применения растворимого CD24 для лечения РА. Модель пассивного переноса для РА была выбрана из-за отношения к болезням человека, а также простоты постановки эксперимента.

### **Краткое описание изобретения**

Предложен белок CD24 для подавления ответа хозяина на молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP), у субъекта. Белок CD24 содержит последовательность зрелого CD24 человека. Зрелая форма CD24 человека, входящая в состав белка по изобретению, состоит из полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1. Дополнительно также раскрывается вариант белка зрелого CD24 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, и зрелый белок CD24 мыши, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3. Белок CD24 по изобретению состоит из зрелого полипептида CD24 человека и фрагмента иммуноглобулина человека (Ig), который может быть слит с N-концом или C-концом зрелого

CD24. Часть Ig может являться Fc частью белка Ig человека, которая может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG3 или IgA. Fc фрагмент может также состоять из шарнирного участка и CH3 и CH4 доменов IgM человека.

Белок CD24 может быть растворимым и может быть гликозилирован. Белок CD24 может быть продуцирован с применением системы экспрессии белка в эукариотах. Система экспрессии может включать вектор, содержащийся в клеточной линии CHO (линия клеток яичника китайского хомячка), или дефектный по репликации ретровирусный вектор. Дефектный по репликации ретровирусный вектор может быть стабильно интегрирован в геном эукариотической клетки.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Аминокислотный состав гибридного белка, CD24 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 5). Подчеркнутые 26 аминокислот являются сигнальным пептидом CD24 (SEQ ID NO: 4). Взятая в рамку, выделенная жирным шрифтом, часть последовательности представляет собой зрелый белок CD24, используемый в гибридном белке (SEQ ID NO: 1). Последняя аминокислота (A или V), которая обычно присутствует в зрелом белке CD24, была убрана из конструкции для того, чтобы избежать иммуногенности. Не подчеркнутые, не выделенные жирным шрифтом буквы являются последовательностью IgG1 Fc, включая шарнирную область и домены CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 6).

Фиг. 2. Способ очистки и процессирования CD24 IgG1 Fc, экспрессированного в клеточных линиях млекопитающих.

Фиг. 3. Варьирования аминокислотной последовательности между зрелыми белками CD24 из мыши (SEQ ID NO: 3) и человека (SEQ ID NO: 2). Жирным шрифтом выделены потенциальные сайты гликозилирования, сайты N-гликозилирования выделены красным.

Фиг. 4. Терапевтический эффект CD24Ig для РА. Самцов мышей линии BALB/c в возрасте 8-10 недель иммунизировали внутривенно в количестве 2 мг/мышь индуцирующей артрит смесью антител ArtritoMab (MDbIoproducts, St Paul, MN). Через 2 суток мышам инъецировали внутривенно 90 мкг ЛПС (LPS-липополисахарид), растворенного в ФСБ (фосфатно-солевом буфере). Развитие болезни наблюдали ежедневно по следующей системе оценки:

0 - нет реакции, норма; 1 - слабое, но отчетливое покраснение и опухание лодыжки/запястья или несомненное покраснение и опухание, ограниченное отдельными пальцами, независимо от количества пораженных пальцев.; 2 - среднее или сильное покраснение и опухание лодыжки/запястья; 3 - покраснение и опухание всей лапы; 4 - максимально воспаленная конечность, включая пальцы, с участием многих суставов. Приведенные данные являются комбинированной оценкой четырех конечностей (среднее значение  $\pm$  ошибка среднего). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . Разница между двумя группами является также значимой на основании теста Фишера PLSD (или безопасный t-тест по Фишеру).

Фиг. 5. WinNonlin компартментный моделирующий анализ фармакокинетики CD24 IgG1. Белые кружки представляют среднее значение из 3 мышей, а линия графика является предсказанной фармакокинетической кривой.

а) Внутривенная инъекция 1 мг CD24 IgG1. б) Подкожная инъекция 1 мг CD24 IgG1. в) Сравнение общих количеств антител в крови с помощью измерения площади под кривой (ППК), периода полувыведения и максимальной концентрации в крови. Заметим, что полностью ППК и  $K_{\max}$  для подкожной инъекции составляет около 80% от внутривенной инъекции, хотя разница не является статистически значимой.

Фиг. 6. Взаимодействие CD24-Siglec G (10) различается между PAMP и DAMP.

А. На ответ хозяина на PAMP не влияет взаимодействие CD24-Siglec G (10).

Б. CD24-Siglec G (10) взаимодействие подавляет ответ хозяина на DAMP, возможно, через CD24-Siglec G/10-ассоциированный SHP-1.

Фиг. 7. Единичная инъекция CD24 Fc снижает клинические показатели АИАК (артрит, индуцированный антителами к коллагену).

А. Схема экспериментов. Мыши BALB/c (возраст 8 недель) получали моноклональные антитела на 1 сутки в сочетании либо с носителем, либо с гибридными белками. Мышам инъецировали ЛПС на 3 сутки и наблюдали ежедневно в течение 3 недель.

Б. CD24 Fc снижает клинические показатели АИАК. Гибридные белки (1 мг/мышь) или носители инъецировали один раз на 1 сутки. Клинические показатели определяли двойным слепым методом. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ . Влияние CD24 воспроизводили в 6 независимых экспериментах, в которые было включено в общем 52 мыши в группе ФСБ и 54 мыши в группе CD24 Fc.

Фиг. 8. CD24 Fc снижает уровни воспалительных цитокинов в суставе и АИАК. АИАК инициируют и лечат как показано на схеме фиг. 7А. Воспалительные цитокины измеряли с помощью набора гранул с антителами от BD Pharmingen.

А. Репрезентативный профиль СКАФ.

Б. Общее значение сниженных цитокинов (среднее значение  $\pm$  ошибка среднего), измеренное в гомогенате сустава.

Фиг. 9. CD24 Fc снижает воспаление и разрушение хряща в суставе. На 7 сутки переднюю и заднюю лапы отделяли, как от обработанных CD24 Fc, так и от контрольных мышей, фиксировали в 4% па-

раформальдегиде в течение 24 ч с последующей декальцификацией 5% муравьиной кислотой. Лапы затем заливали в парафин и продольный срез окрашивали гематоксилин-эозином и Сафранином О (Sigma-Aldrich).

Фиг. 10. Терапевтический эффект CD24 Fc, введенного на 5 сутки индуцирования АИАК. Индуцированные АИАК мыши были случайным образом разделены на две группы, получающие либо носитель (ФСБ), либо CD24 Fc. Мышей оценивали двойным слепым методом. Показан репрезентативный из трех независимых экспериментов.

Фиг 11. Низкие дозы CD24 Fc предупреждают развитие АИАК.

А. Схема экспериментов.

Б. Клиническая оценка артрита, оценка двойным слепым способом.

Фиг. 12. Siglecg (иммуноглобулин-подобный лектин, связывающий сialовую кислоту) необходим для терапевтического эффекта CD24 Fc, WT (дикий тип) (а) и Siglecg  $-/-$  мыши (б) получали либо контроль с носителем, либо CD24 Fc в сочетании с коктейлем антиколлагеновых моноклональных антител. Клинические показатели определяли ежедневно двойным слепым методом.

### Подробное описание изобретения

Изобретатели обнаружили, что растворимая форма CD24 высоко эффективна при лечении ревматоидного артрита.

#### 1. Определения.

Терминология, используемая здесь, предназначена для описания только конкретных воплощений и не ограничивается ими. При использовании в описании и формуле изобретения формы единственного числа включают также множественное число, если в контексте не указано явно на другое.

Для перечисления числовых интервалов, указанных здесь, каждый промежуточный номер между ними ожидается с той же степенью точности. Например, для интервала 6-9, числа 7 и 8 предполагаются в дополнение к 6 и 9, а для интервала 6,0-7,0 явно предполагаются числа 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9 и 7,0.

"Пептид" или "полипептид" является связанной последовательностью аминокислот и может быть естественной, синтетической или сочетанием естественной и синтетической.

"По существу идентичны" может означать, что первая и вторая аминокислотные последовательности по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% перекрывают область из 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 или 300 аминокислот.

"Лечение" или "лечить" по отношению к защите животного от заболевания, означает предупреждение, подавление, прекращение или полное устранение заболевания. Предупреждение заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному после индуцирования заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному после клинического проявления заболевания.

"Вариант" может означать пептид или полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности путем вставки, удаления или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Показательные примеры "биологической активности" включают способность связывать толл-подобный рецептор и быть связанным специфическим антителом. Вариант может также означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична контрольному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативное замещение аминокислоты, то есть замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных участков) обычно считают незначительным изменением. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, в частности, учетом индекса гидрофобности аминокислот, как известно специалистам. Kute et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислоты основан на рассмотрении ее гидрофобности и заряда. Специалистам известно, что аминокислоты, имеющие похожие индексы гидрофобности, могут быть замещены и при этом сохранять функцию белка. В одном аспекте аминокислоты, имеющие индексы гидрофобности  $\pm 2$ , являются замещенными. Гидрофильность аминокислот может также быть использована для выявления замещений, которые приведут к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет вычислить наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезный критерий, который, как было показано, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью (патент США № 4554101, включен сюда полностью путем ссылки). Замещение аминокислот, имеющих похожие значения гидрофильности, может привести к пептидам, сохраняющим биологическую активность, например, иммуногенность, как известно специалистам. Замещения могут быть произведены аминокислотами, имеющими значения гидрофильности, находящиеся в пределах  $\pm 2$  друг от друга. Как на индекс гидрофобности, так и на индекс гидрофильности влияет, в ча-

стности, боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением аминокислотные замещения, которые совместимы с биологической функцией, как известно, зависят от относительного подобию аминокислот, и в частности боковых цепей этих аминокислот, как показывают гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и другие свойства.

## 2. CD24.

В данном описании приведен белок CD24, который содержит аминокислотную последовательность зрелого полипептида CD24 человека, представляющую собой SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPT-NATTK (SEQ ID NO: 1). CD24 может быть растворим. CD24 по изобретению является слитым с Fc фрагментом белка иммуноглобулина человека (Ig). CD24 может существовать в одной из двух аллельных форм таким образом, что С-терминальная аминокислота зрелого CD24 человека может быть валином или аланином. С-терминальный валин или аланин может быть иммуногенным, он исключен из CD24 по изобретению, для снижения его иммуногенности. Разница между двумя аллелями может влиять на риск развития аутоиммунных заболеваний, включая множественный склероз и РА. Тем не менее, так как две аллельные формы влияют на уровни экспрессии формы, связанной с мембраной, изменения не должны влиять на функцию CD24.

Несмотря на существенные изменения последовательности в аминокислотной последовательности зрелых CD24 мыши и человека, они являются функционально эквивалентными во взаимодействии с молекулярными паттернами, связанными с опасностью (DAMP). Поскольку ответ хозяина на DAMP считается важным для патогенеза РА, CD24 мыши и человека могут быть функционально эквивалентными при лечении РА. Как результат консервативности последовательностей между CD24 мыши и человека, прежде всего в С-конце и в частоте сайтов гликозилирования, значительные изменения в зрелых CD24 белках могут допущены при применении CD24 для лечения РА, особенно если эти изменения не влияют на консервативные остатки на С-конце или не влияют на сайты гликозилирования CD24 либо мыши, либо человека.

### А. Слияние.

CD24 может быть слит по своему N- или С-концу с Fc фрагментом белка IgG человека. Fc часть может включать шарнирную область и CH2 и CH3 домены белка IgG.

Белок IgG может быть IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, или IgA человека. Fc часть может включать SEQ ID NO: 6. Белок Ig может также быть IgM, а Fc часть может включать шарнирную область и CH3 и CH4 домены IgM. CD24 может также быть слит по своему N- или С-концу с белковой меткой, которая может являться GST, His или FLAG. Способы получения гибридных белков и очистка гибридных белков хорошо известны специалистам.

### Б. Продуцирование.

CD24 может быть сильно гликозилирован и может участвовать в функциях CD24, таких как стимулирование и взаимодействие с молекулярными паттернами, связанными с опасностью. CD24 может быть получен с применением эукариотической системы экспрессии. Система экспрессии может повлечь за собой экспрессию из вектора в клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO). Система может также быть вирусным вектором, таким как ретровирусным вектором, дефектным по репликации, который может быть использован для инфицирования эукариотических клеток. CD24 может также был получен из стабильной линии клеток, которые экспрессируют CD24 из вектора или части вектора, которая была интегрирована в клеточный геном. Стабильная клеточная линия может экспрессировать CD24 из интегрированного ретровирусного вектора, дефектного по репликации. Система экспрессии может быть GPEx™.

## 3. Способ лечения.

CD24 может быть применен для лечения ревматоидного артрита. CD24 может быть введен субъекту при необходимости. Субъект может быть млекопитающим, таким как человек.

### А. Комбинированная терапия CD24.

CD24 может быть комбинирован с другим лекарственным средством, таким как лекарства, модифицирующие течение заболевания (ЛМТЗ). Препарат может быть нестероидным противовоспалительным препаратом (НПВП), который может быть производным пропионовой кислоты, производным уксусной кислоты, производным еноловой кислоты, производным фенаминовой кислоты или селективным ингибитором Cox2. Лекарственное средство может также быть кортикостероидом или метотрексатом. Лекарственное средство может быть биологическим, которое может быть антагонистом ФНО-а (фактор некроза опухоли), таким как анти-ФНО-а антителом или гибридным белком, который связывается с ФНО-а (Enbrel), анти-СО20 моноклональным антителом, антагонистом со-стимуляторной молекулы CD80 или CD86, таким как моноклональное антитело или гибридный белок (CTLA4Ig), который связывается с двумя молекулами, или антагонистом для рецептора либо IL-1, либо IL-6. CD24 и другой препарат могут быть введены вместе или последовательно.

### Б. Фармацевтическая композиция.

CD24 может содержаться в фармацевтической композиции, которая может включать растворитель, который может сохранять CD24 стабильным в течение длительного периода. Растворитель может быть

ФСБ, который может сохранять CD24 стабильным в течение по меньшей мере 36 месяцев при -20°C (-15 ~ -25°C). Растворитель может быть способен содержать CD24 в комбинации с другим лекарственным средством.

#### В. Дозировка.

Доза для применения для человека может в конечном счете быть определена через клинические испытания для определения дозы с приемлемой токсичностью и клинической эффективностью. Начальная клиническая доза для человека может быть определена через изучение фармакокинетики и токсичности у грызунов и нечеловекообразных приматов. Доза CD24 может быть от 0,01 до 1000 мг/кг и может быть от 1 до 500 мг/кг, в зависимости от серьезности заболевания, подлежащего лечению и способа введения.

#### Г. Введение.

Способ введения фармацевтической композиции может быть парентеральным. Парентеральное введение включает, но не ограничено, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное подкожное, внутримышечное, подоболочечное, внутрисуставное и непосредственную инъекцию в пораженный сустав. Для ветеринарного применения агент может быть введен как соответствующая приемлемая формулировка в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить режим дозирования и способ введения, который является наиболее подходящим для конкретного животного. Фармацевтическая композиция может быть введена пациенту, являющемуся человеком, кошкой, собакой, большим животным, или птице.

CD24 может быть введен одновременно или "метрономически" с другим лечением. Термин "одновременный" или "одновременно", используемый здесь, означает, что CD24 и другое лечение вводятся в течение 48 ч, предпочтительно 24 ч, более предпочтительно 12 ч, еще более предпочтительно 6 ч и наиболее предпочтительно 3 ч или менее друг от друга. Термин "метрономически", используемый здесь, означает введение агента во время, отличное от другого лечения и с определенной частотой относительно повторного введения.

CD24 может быть введен в любой момент перед другим лечением, включая приблизительно 120, 118, 116, 114, 112, 110, 108, 106, 104, 102, 100, 98, 96, 94, 92, 90, 88, 86, 84, 82, 80, 78, 76, 74, 72, 70, 68, 66, 64, 62, 60, 58, 56, 54, 52, 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч; 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 и 1 мин.

CD24 может быть введен в любой момент перед вторым лечением CD24, включая приблизительно 120, 118, 116, 114, 112, 110, 108, 106, 104, 102, 100, 98, 96, 94, 92, 90, 88, 86, 84, 82, 80, 78, 76, 74, 72, 70, 68, 66, 64, 62, 60, 58, 56, 54, 52, 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч; 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 и 1 мин.

CD24 может быть введен в любой момент перед другим лечением, включая приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 мин; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 и 120 ч.

CD24 может быть введен в любой момент после предварительного лечения CD24, включая приблизительно 120, 118, 116, 114, 112, 110, 108, 106, 104, 102, 100, 98, 96, 94, 92, 90, 88, 86, 84, 82, 80, 78, 76, 74, 72, 70, 68, 66, 64, 62, 60, 58, 56, 54, 52, 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч; 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 и 1 мин.

Следующие примеры приведены здесь для иллюстрации способов по настоящему изобретению и никоим образом не ограничивают применение указанных способов.

#### Пример 1.

##### Растворимые белки CD24.

Внеклеточный домен CD24 был слит с IgG1 Fc. Аминокислотный состав CD24 гибридного белка приведен на фиг. 1. Затем создали ретровирусный вектор, дефектный по репликации, который направляет экспрессию гибридного белка CD24Ig. GPEx™ (сокращение для продукта генной экспрессии) система предлагает несколько важных преимуществ, наиболее важным из которых является образование в среднем >1000 вставок/клетку, но только с 1 копией/вставку. Более того, так как ретровирус предпочтительно вставляется в транскрипционно активный локус, GPEx™ дает в результате высокий уровень экспрессии целевого белка. Были получены стабильные клеточные линии, которые продуцируют высокий выход CD24Ig. В дополнение были получены 45 г продукта GLP стадии и ~100 г продуктов cGMP стадии. Способы, использованные для дальнейшей переработки среды, собранной из биореактора, резюмированы на технологической схеме ниже (фиг. 2).

##### Осветление выхода.

Культуральную среду из биореактора осветляют с применением Cuno 60M02 Maximzer глубинных фильтров с последующим фильтрованием через Millipore Opticlar фильтр с размером пор 0,22 мкм. Фильтрат собирают в стерильные мешки для сбора образцов. Отбирают пробы для определения выхода с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

##### Очистка на белке А.

Осветленную среду пропускают через колонку со смолой с белком А (GE Healthcare MabSelect) в

концентрации, не превышающей 16 г/л смолы (по ИФА), и при времени контакта 4 мин. Колонку промывают уравнивающим буфером (50 мМ Трис+0,15М NaCl, pH 7,5), затем 10 мМ натрий цитрат/лимонная кислота pH 6,0 в течение 5 cvs. Связанный CD24Ig элюируют с колонки с применением 10 мМ цитрат натрия/лимонная кислота, pH 3,5.

Инактивация вируса.

Фракцию элюата с белка А немедленно доводят до pH 3,0 добавлением 2М соляной кислоты и выдерживают при этом pH в течение 30 мин при температуре окружающей среды. Затем ее доводят до pH 5,0 добавлением 1М триса основного и фильтруют для осветления с применением 0,65 мкм стекловолонного фильтра (Sartorius Sartopure GF2) и 0,2 мкм (Sartorius Sartopure 2) в стерильный мешок для отбора проб.

Хроматография на SP-Сепарозе.

Вирусно-инактивированный материал наносят на колонку с SP-Sepharose (GE Healthcare) в концентрации, не превышающей 25 г/л смолы (на основании A280, составляющей 1,22=1 мг/мл) и линейной скорости потока 250 см/ч. Колонку промывают уравнивающим буфером (10 мМ цитрата натрия/лимонная кислота pH 5,0), и связанный CD24Ig элюируют с колонки с применением 10 мМ цитрата натрия/лимонная кислота + NaCl, pH 5,0. Вытекающий раствор собирают в стерильный мешок для сбора.

Хроматография на Mustang Q.

Элюат после SP-Sepharose доводят до pH 7.5 добавлением 1М трис основания и разводят водой для инъекций для понижения проводимости. Разбавленный материал наносят на фильтр Mustang Q (Pall) в концентрации, не превышающей 0,5 г/л смолы (на основании A280, составляющего 1,22=1 мг/мл) и при скорости потока 5 объемов колонки/мин. Фильтр промывают уравнивающим буфером (10 мМ трис pH 7,5) и CD24-Fc находится в протоке и его собирают в стерильный мешок для отбора.

Фильтрация вируса.

Проток после Mustang Q затем фильтруют при постоянном давлении 30 фунтов/кв.дюйм (206842,8 Па) через 0,2 мкм фильтр и Millipore NFP вирусный фильтр (номинальный размер пор 20 нм) и собирают в стерильные мешки для отбора.

Концентрирование и конечная формулировка.

Продукт концентрируют и диафильтруют, применяя мембрану для ультрафильтрации 10 кДа (Millipore Prep/Scale) в 10 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорида натрия при pH 7,2 при приблизительно 10 мг/мл конечной концентрации, как определено по поглощению при 280 нм. Из общего объема, находящегося в боксе биобезопасности, отбирают аналитические образцы. Проводят маркирование и отправляют образцы на контроль качества, в то время как аликвоты общего объема хранят при 2-8°C до разрешения выпуска.

Изучение вирусной очистки.

Оценку очистки от вируса проводили в Cardinal Health, NC по образцам, подготовленным в СНМ. Квалифицированные ученые из Gala Biotech провели стадии хроматографии и фильтрации на Cardinal Health Viral Validation предприятия с помощью персонала Cardinal Health. Процедура уменьшения масштаба была разработана из 200 л масштабного процесса. Для этого исследования были выбраны два вируса. Первым был Xenotropic murine Leukemia вирус (XMuLv), который является оболочечным РНК вирусом размером 80-130 нм из семейства вирусов Retroviridae. Вторым был свиной Parvovirus (PPV), который является безоболочечным ДНК вирусом размером 18-26 нм. Он считается грубым вирусом, и ожидалось, что для него будет показано гораздо более низкое снижение вируса с помощью указанного протокола очистки, чем для XMuLv.

Пример 2.

Применение CD24Fc для лечения РА.

Этот пример демонстрирует, что CD24 может быть применен для лечения РА. Так как анти-коллагеновые антитела присутствуют у пациентов с РА до начала заболевания и так как анти-коллагеновые антитела способны индуцировать РА-подобную патологию у мышей, установленная модель пассивного переноса РА была использована для проверки эффективности растворимого CD24. Гибридный белок был растворен в ФСБ носителе при 10 мг/мл. Как показано на фиг. 4, комбинация 4 анти-коллагеновых антител вызвала тяжелые клинические симптомы на всех конечностях, имеющие пиковые значения на 7 сутки в обеих группах как с носителем, так и обработанных CD24Fc. Заболевания характеризовались краснотой и опуханием всей лапы во всех суставах. Некоторые суставы максимально воспалены, и затронуты пальцы и множественные суставы. Таким образом, растворимый белок не влияет на начало заболеваний. Удивительно, но группа, обработанная CD24Fc, показала гораздо более быстрое восстановление. Снижения клинических показателей весьма значительны, начиная с 9 суток и продолжая в течение всего периода наблюдения 24 суток. Таким образом, CD24Fc обеспечивает эффективное лечение РА. Интересно, так как эффект наблюдается после пика заболевания, то, по-видимому, блокирование CD24 влияет на процесс хронического заболевания после инициирования воспаления.

Пример 3.

Фармакокинетика CD24.

1 мг CD24IgG1 инъецировали интактным C57BL/6 мышам и собирали образцы крови в различные

временные точки (5 мин; 1, 4, 24, 48 ч; 7, 14 и 21 сутки), по 3 мыши на каждую временную точку. Сыворотку развели 1:100 и определили уровни CD24Ig, используя сэндвич ИФА, применяя очищенные антитела к CD24 человека (3.3 мкг/мл) в качестве первых антител и конъюгированные с пероксидазой антитела козы против IgG Fc человека (5 мкг/мл) как детектирующие антитела. Как показано на фиг. 5а, кривая распада CD24Ig выявила типичный двухфазовый распад белка. Первая фаза биораспределения имеет срок полувывода 12,4 ч. Вторая фаза следует модели первоочередного вывода из центрального компартмента. Время полувывода для второй фазы составляет 9,54 суток, что подобно времени полувывода для антител *in vivo*. Эти данные позволяют предположить, что гибридный белок очень стабилен в кровеносном русле. В другом исследовании, в котором гибридный белок инъецировали подкожно, наблюдали почти идентичное время полувывода 9,52 суток (фиг. 5б). Более того, так как это заняло приблизительно 48 ч для достижения пиковых уровней CD24Ig в крови, а общее количество гибридного белка, как было измерено с помощью AUC (площади под кривой), было существенно то же при любом пути инъецирования. Таким образом, с терапевтической точки зрения разные пути введения инъекции не должны влиять на терапевтический эффект лекарственного средства. Это наблюдение значительно упрощает разработку экспериментов для изучения токсичности на приматах и клинические испытания.

Пример 4.

CD24 для лечения РА.

В течение десятилетий считалось, что РА является преимущественно аутоиммунным заболеванием, опосредованным Т-клетками. В последние два десятилетия снова пересматривают возможную роль антител и В-лимфоцитов в патогенезе РА. Таким образом, в дополнение к ревматоидным факторам, источник аутореактивных антител найден у пациентов с РА, хотя это не было окончательно отнесено к человеку. Однако несколько линий данных показали, что на мышинных моделях антитела, специфичные либо для общих, либо для ткане-специфичных антигенов, достаточны для того, чтобы вызвать симптомы РА. Например, обнаружено, что антитела из K/BxN TCR трансгенных мышей полностью способны переносить РА-подобные заболевания к новому хозяину. Эта модель теперь называется АИАК - артрит, индуцированный антителами к коллагену (CAIA).

Генетический анализ модели АИАК указал на критическую роль комплемента. Хотя существуют и другие возможности, эти требования предполагают возможное включение повреждение ткани, опосредованное антителами, в патогенез РА. Связь между повреждением ткани и воспалением является давним наблюдением в иммунологии. Почти два десятилетия назад Матцингер (Matzinger) предложил то, что обычно называют теорией опасности. По существу, предполагалось, что иммунная система включается, когда организм хозяина находится в опасности. Хотя природа опасности была не очень точно определена в то время, было установлено, что некроз связан с высвобождением внутриклеточных компонентов, таких как HMGB1 и белки теплового шока, которые были названы DAMP, то есть молекулярные паттерны, связанные с опасностью. Обнаружили, что DAMP усиливают продуцирование воспалительных цитокинов и аутоиммунные заболевания. В моделях на животных найдено, что ингибиторы HMGB1 и HSP90 усиливают РА. Участие DAMP усилило перспективность того, что негативная регуляция ответа хозяина на DAMP может быть изучена для терапии РА.

Взаимодействие CD24-Siglec 10 в ответе хозяина на повреждение ткани.

Применив индуцированный ацетаминофеном некроз печени и обеспечив воспаление, мы наблюдали, что через взаимодействие с Siglec G, CD24 дает сильную негативную регуляцию ответа хозяина на повреждение ткани. CD24 является ГФИ-якорной молекулой, которая широко экспрессируется в гематопозитических клетках и стволовых клетках других тканей. Генетический анализ ряда аутоиммунных заболеваний у человека, включая множественный склероз, системную волчанку, РА и артрит гигантских клеток, показал существенную связь между полиморфизмом CD24 и риском аутоиммунных заболеваний. Siglec G является членом семейства I-лектинов, выделенным по их способности распознавать структуры, содержащие сиаловые кислоты. Siglec G распознает структуры, содержащие сиаловые кислоты, на CD24 и негативно регулирует продуцирование воспалительных цитокинов дендритными клетками (16). С точки зрения своей способности взаимодействовать с CD24 Siglec 10 мыши и Siglec G человека функционально эквивалентны. Однако неясно, существует ли точная корреляция между мышинным и человеческим гомологами. Хотя механизм остается полностью изученным, вполне вероятно, что связанный с Siglec G SHP1 может быть вовлечен в негативную регуляцию. Эти данные, опубликованные недавно в журнале Science, приводят к новой модели, в которой взаимодействие CD24-Siglec G/10 может играть критическую роль в разграничении молекулярных паттернов, связанных с патогеном (PAMP) и DAMP (фиг. 6).

По меньшей мере два перекрывающихся механизма могут объяснять функцию CD24. Во-первых, путем связывания с рядом DAMP CD24 может быть ловушкой для воспалительных стимулов для предотвращения их взаимодействия с TLR или RAGE. Это мнение поддерживается наблюдениями, которые показывают, что CD24 ассоциирован с некоторыми молекулами DAMP, включая HSP70, 90, HMGB1 и нуклеолин. Во-вторых, возможно после ассоциации с DAMP, CD24 может стимулировать передачу сигнала с помощью Siglec G. Оба механизма могут действовать совместно, так как мыши с направленной мутацией по любому из генов показывали более сильный воспалительный ответ. На самом деле DC (дендритные клетки), полученные из костного мозга, взятого либо от CD24<sup>-/-</sup>, либо от Siglec G<sup>-/-</sup> мышей,



продуцировали гораздо больше воспалительных цитокинов, чем при стимуляции любым из HMGB1, HSP70 или HSP90. Напротив, не было найдено никакого эффекта при их ответе на PAMP, такой как ЛПС и PolyI:C. Эти данные не только обеспечили механизм для врожденного иммунитета для распознавания патогена от повреждения ткани, но также предполагают, что CD24 и Siglec G могут быть потенциальными терапевтическими мишенями для лечения заболеваний, связанных с повреждением тканей.

Терапевтический эффект CD24 на артрит, индуцированный антителами к коллагену.

Возможность стимулирования этого пути для лечения РА была изучена, учитывая возможную роль врожденного иммунитета к повреждению ткани в патогенезе РА и роль CD24-Siglec G/10 пути в негативном регулировании такого ответа.

Патогенез практически всех аутоиммунных заболеваний включает индуцирование иммунного ответа на аутоантиген и аутоиммунное разрушение. Фокус был сделан на аутоиммунной фазе разрушения на основании новой функции взаимодействия CD24/Siglec G. Таким образом, для предварительного анализа модель артрита, индуцированного антителами к коллагену, была принята для оценки потенциального терапевтического эффекта.

Как показано на фиг. 7а, АИАК индуцировали у мышей BALB/c в возрасте 8 недель посредством внутривенной инъекции коктейля 4 анти-коллагеновых моноклональных антител (MD Biosciences, St. Paul, MN) при концентрации 2 мг/мышь на 1 сутки, и внутрибрюшинной инъекции 100 мкг/мышь LPS (MD Bioscience) на 3 сутки. Мыши были обработаны на 1 сутки либо 1 мг CD24Fc, либо равным объемом 1-кратного ФСБ носителя в качестве негативного контроля. Как показано на фиг. 7б, по сравнению с контролем с носителем, CD24Fc обеспечивает высоко значимый терапевтический эффект.

Для понимания механизма, по которому CD24Fc снижает артрит в данной модели, измеряли цитокины из гомогенизированных суставов мышей, обработанных CD24Fc или ФСБ контролем, и измерен супернатант из 200 мкг гомогената ткани с помощью набора гранул с антителами к цитокинам. Типичный пример показан на фиг. 8а, в то время как сводные данные показаны на фиг. 8б. Эти данные показывают, что систематически вводимый CD24 снижает уровни многих воспалительных цитокинов, включая TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1(CCL2) и IL-1 $\beta$ .

Эффект CD24Fc подтверждается гистологическим анализом синовиальных суставов АИАК мышей, как показано на фиг. 9. На 7 сутки после индуцирования артрита гематоксилин-эозинное окрашивание показало, что синовиальная оболочка сустава в группе с ФСБ сильно инфильтрирована воспалительными клетками, включающими нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты (фиг. 9а). Это было намного меньше у мышей, обработанных CD24Fc. В дополнение сильные повреждения суставов были выявлены по потере окрашивания сафранином О красным у обработанных ФСБ мышей (фиг. 9в), но не у обработанной CD24Fc группы (фиг. 9г).

Чтобы определить, будет ли у мышей CD24Fc иметь терапевтическое влияние на текущий РА, лечение начинали либо на 5, либо на 7 сутки после индуцирования РА. Как показано на фиг. 10, существенное снижение РА показателей наблюдали уже через 2 суток после обработки CD24Fc. Терапевтический эффект сохранялся в течение оставшегося периода наблюдения даже без дополнительной обработки. Эти данные далее усилили терапевтический потенциал CD24Fc для текущих заболеваний.

Для определения терапевтических дозировок CD24Fc для человека, для CD24Fc был определен титр в широком интервале дозировок. Как показано на фиг. 11, уже 2 мкг/мышь было достаточным для получения статистически значимого терапевтического эффекта.

Siglecg-зависимый терапевтический эффект CD24Fc.

Чтобы определить, будет ли CD24Fc защищать мышей путем взаимодействия с Siglec G, мы определили, зависит ли терапевтический эффект от гена Siglecg. Так как Siglecg-зависимые мыши были получены с помощью ES клеток из C57BL/6 мышей, мы использовали WT C57BL/6 мышей в качестве контроля. Как показано на рис. 12а, так как известно, что B6 мыши менее подвержены АИАК, то общие показатели заболевания ниже, чем наблюдали для мышей BALB/c. Тем не менее, уже одна инъекция CD24Fc по существу уничтожила клинические признаки у мышей дикого типа. Важно отметить, что даже если заболевание менее сильное у Siglecg-дефицитных мышей, CD24Fc не имеет терапевтического эффекта. Таким образом, терапевтический эффект CD24Fc строго зависит от гена Siglecg.

Взяты вместе, приведенные данные показывают высокую терапевтическую эффективность CD24Fc для АИАК. Учитывая наши обширные данные по безопасности, стабильности и наше успешное производство CD24Fc, все указывает на большой потенциал указанного гибридного белка как терапевтического средства для РА.

Пример 5.

Токсичность.

Обширные исследования токсичности на грызунах и нечеловекообразных приматах не показали связанной с лекарственным средством токсичности при дозах от 12.5 до 125 мг/кг у мышей и нечеловекообразных приматов.

Цитированные источники.

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

2. Pierres, M., P. Naquet, J. Barbet, S. Marchetto, I. Maries, C. Devaux, M. Barad, R. Hyman, and G. Rougon. 1987. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J1 Id is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Eur J Immunol* 17: 1781-1785.

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 hemato-lymphoid and neural cell lineages. *Eur J Immunol* 21: 1397-1402.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

11. Otaegui, D., A. Saenz, P. Camano, L. Blazquez, M. Goicoechea, J. Ruiz-Martinez, J. Olaskoaga, J. A. Empanaza, 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.

12. Rueda, B., J.A. Miranda-Filloy, J. Martin, and M.A. Gonzalez-Gay. 2008.

Association of CD24 gene polymorphisms with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J. Rheumatol.* 35:850-854.

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

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.

15. Zhou, Q., K. Rammohan, S. Lin, N. Robinson, O. Li, X. Liu, X.F. Bai, L. Yin, B.

Scarberry, P. Du, M. You, K. Guan, P. Zheng, and Y. Liu. 2003. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15041-15046.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.
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.
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.
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.
30. Kay, R., F. Takei, and R.K. Humphries. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J1 Id heat-stable antigens. *J Immunol* 145: 1952-1959.
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.
32. Liu, Y. 1994. The costimulatory pathway for T cell response. RG Landes, Austin.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

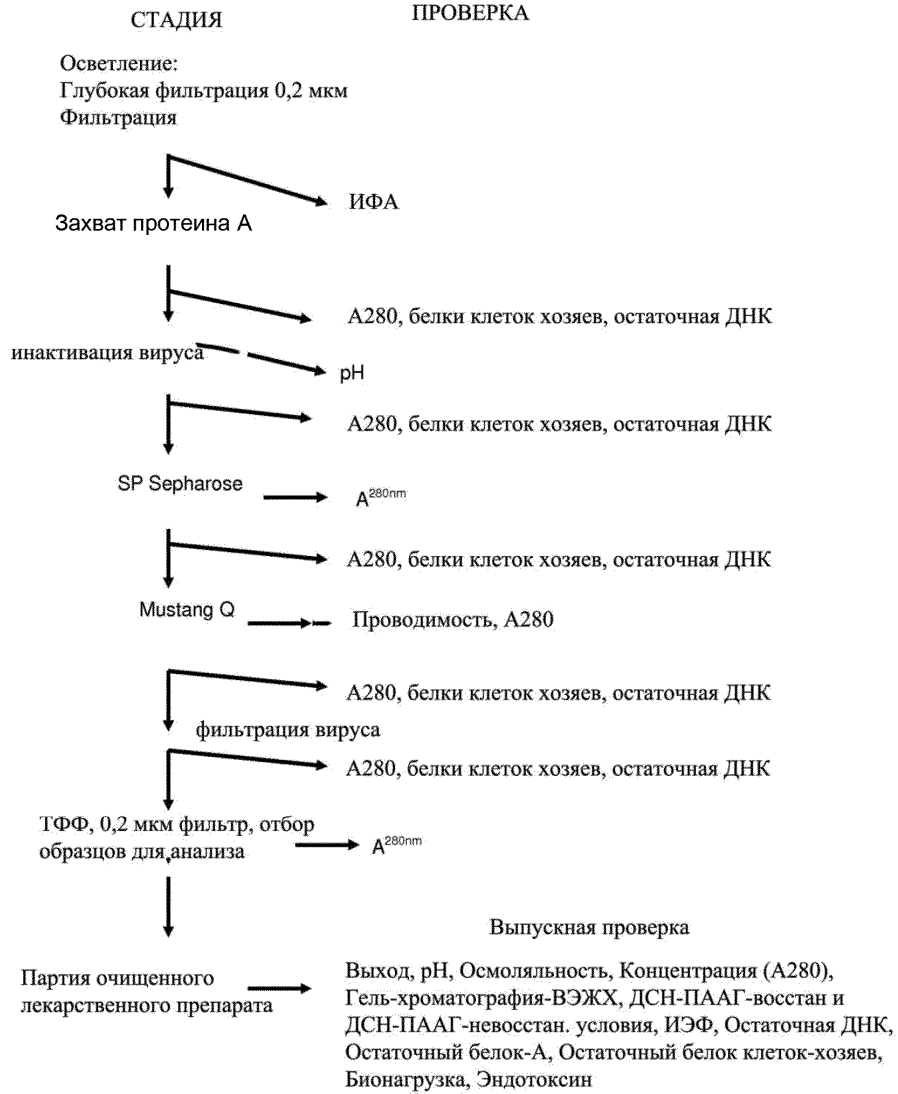
1. Белок CD24 для подавления ответа хозяина на молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP) у субъекта, где аминокислотная последовательность белка CD24 состоит из зрелого полипептида CD24 человека, слитого с Fc фрагментом белка иммуноглобулина человека (Ig), где последовательность зрелого полипептида CD24 человека состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 и где белок CD24 не содержит аланина или валина в положении, непосредственно С-терминальном по отношению к SEQ ID NO: 1.
2. Белок CD24 по п.1, где Fc фрагмент слит с С-концом белка CD24.
3. Белок CD24 по п.1, который является гликозилированным.
4. Белок CD24 по п.1, где Fc фрагмент состоит из шарнирной области и CH2 и CH3 доменов белка Ig человека и где Ig выбран из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA.
5. Белок CD24 по п.1, где Fc фрагмент состоит из шарнирной области и CH3 и CH4 доменов IgM.
6. Белок CD24 по п.1, полученный с помощью эукариотической системы экспрессии белка.
7. Белок CD24 по п.6, где система экспрессии включает вектор, содержащийся в клеточной линии яичников китайского хомячка (CHO), или ретровирусный вектор, дефектный по репликации.
8. Белок CD24 по п.7, где ретровирусный вектор, дефектный по репликации, стабильно интегрирован в геном эукариотической клетки.
9. Белок CD24 по п.1, где аминокислотная последовательность белка CD24 состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 и последовательности Fc фрагмента SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 слита с С-концом SEQ ID NO: 1.
10. Белок CD24 по любому из пп.1-9, который является растворимым.

```

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNGLAP
NPTNATTKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPPVLDS
DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

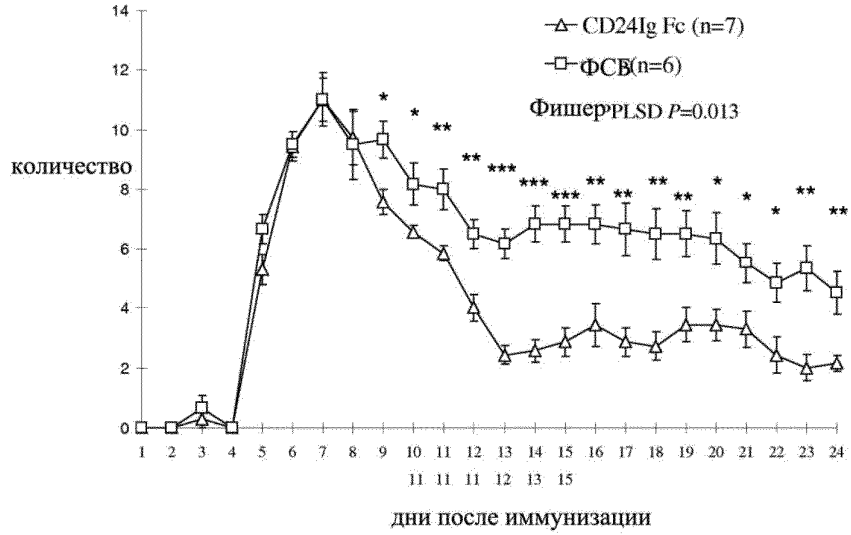
Фиг. 1



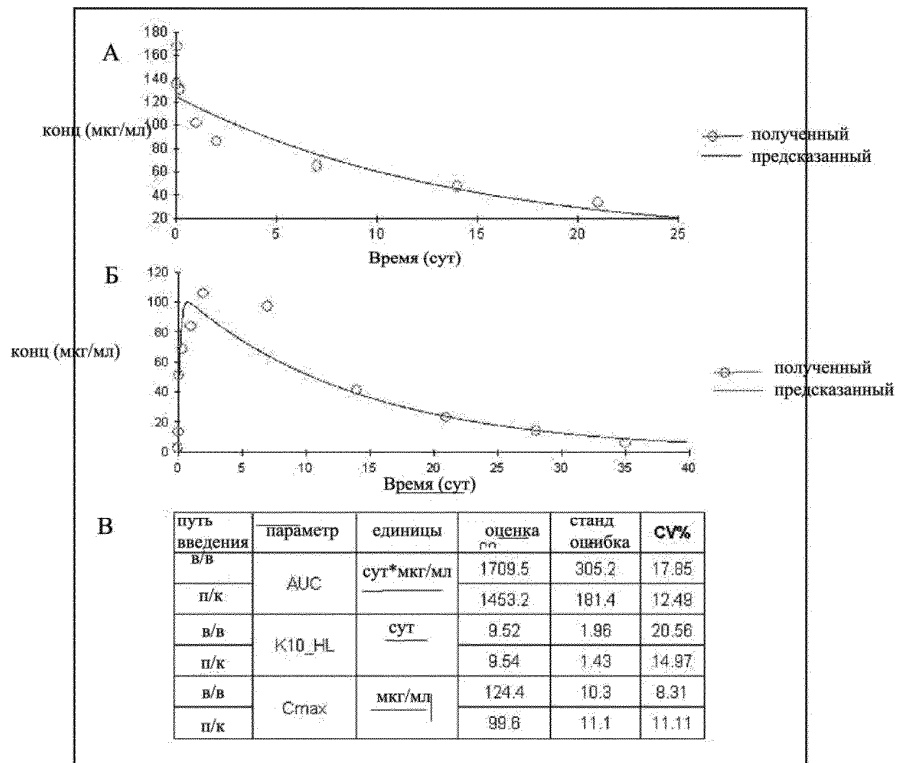
Фиг. 2

мышь	cd24	<b>NQTSVAPFPGN--QNISAS-----PNPTNATTRG</b>
		_* _ * * * * * * * * * _ _
человек	CD24	<b>SETTTGTSS-NSSQSTNS-GLAPNPTNATTKA (V)</b>

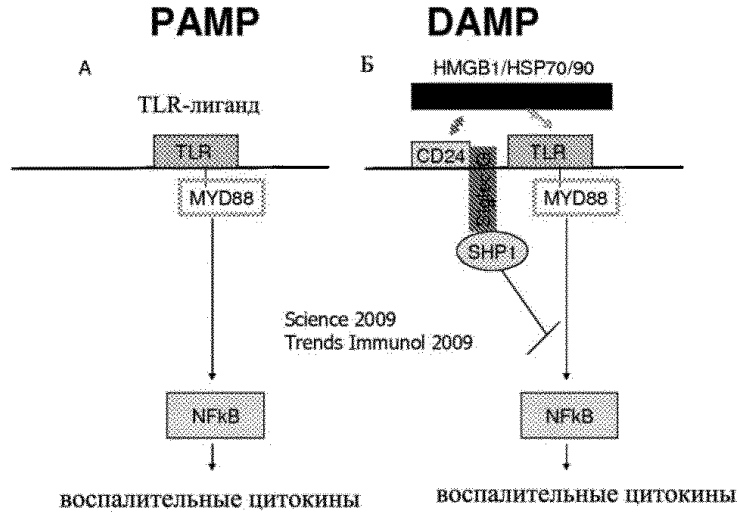
Фиг. 3



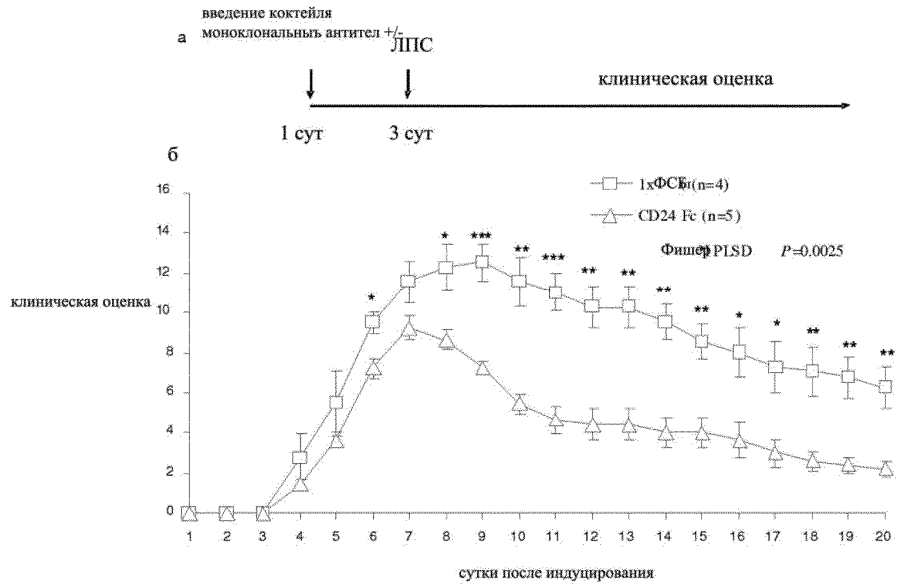
Фиг. 4



Фиг. 5

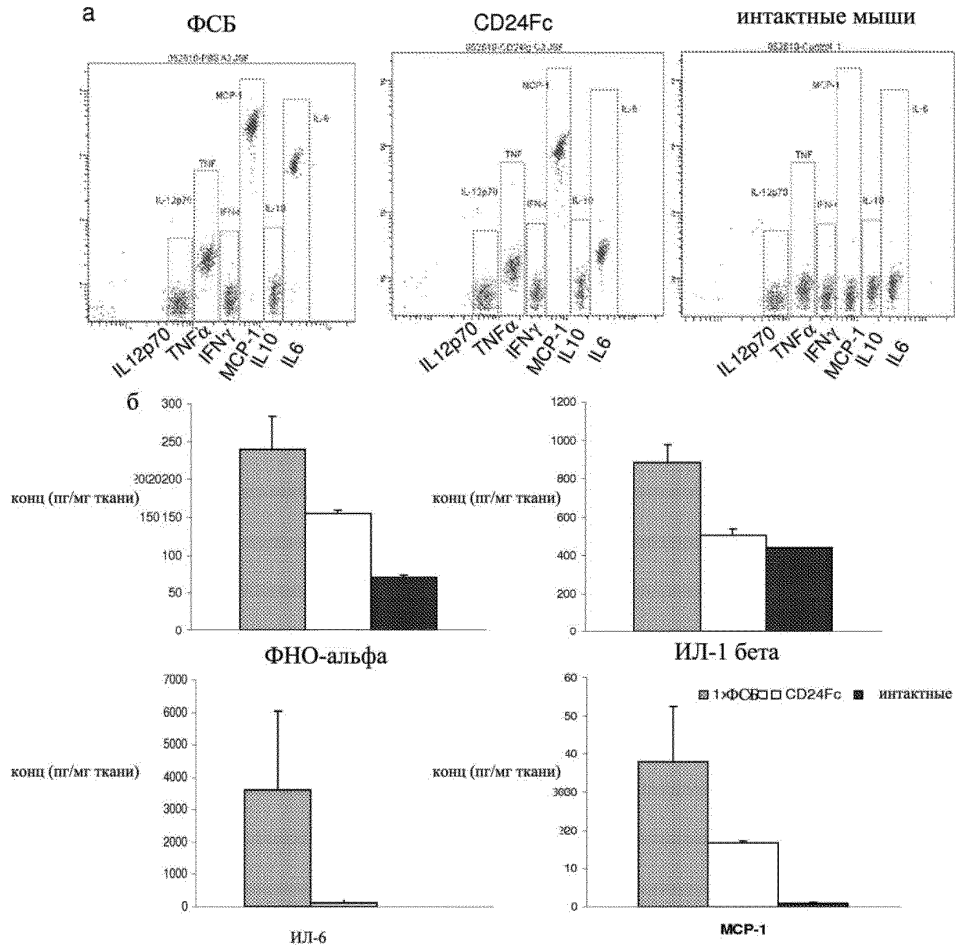


Фиг. 6

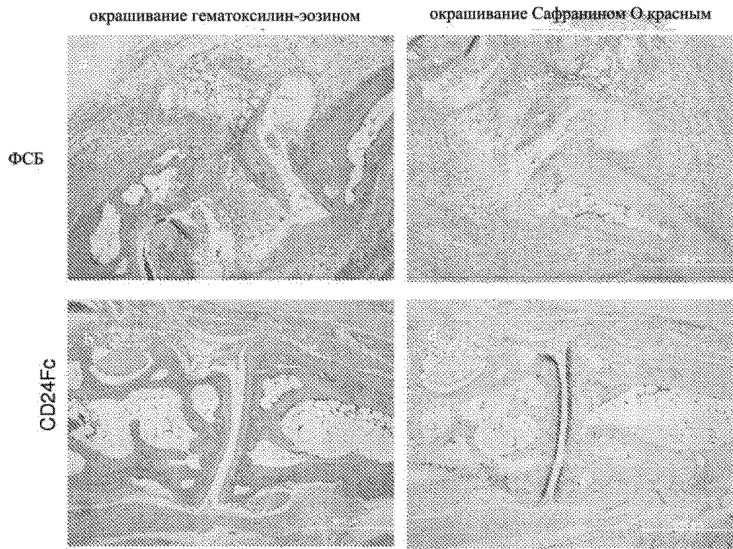


Фиг. 7

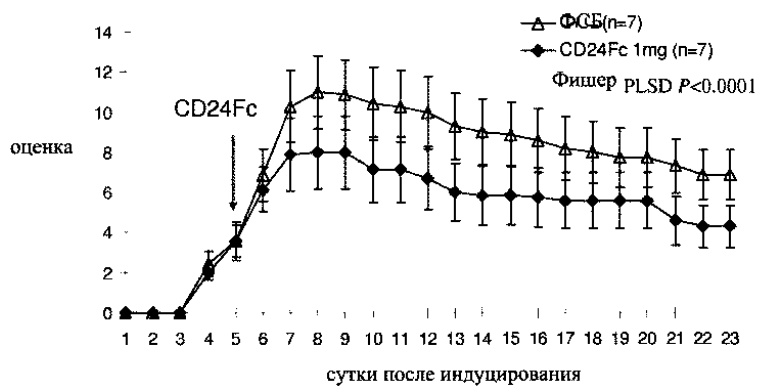




Фиг. 8

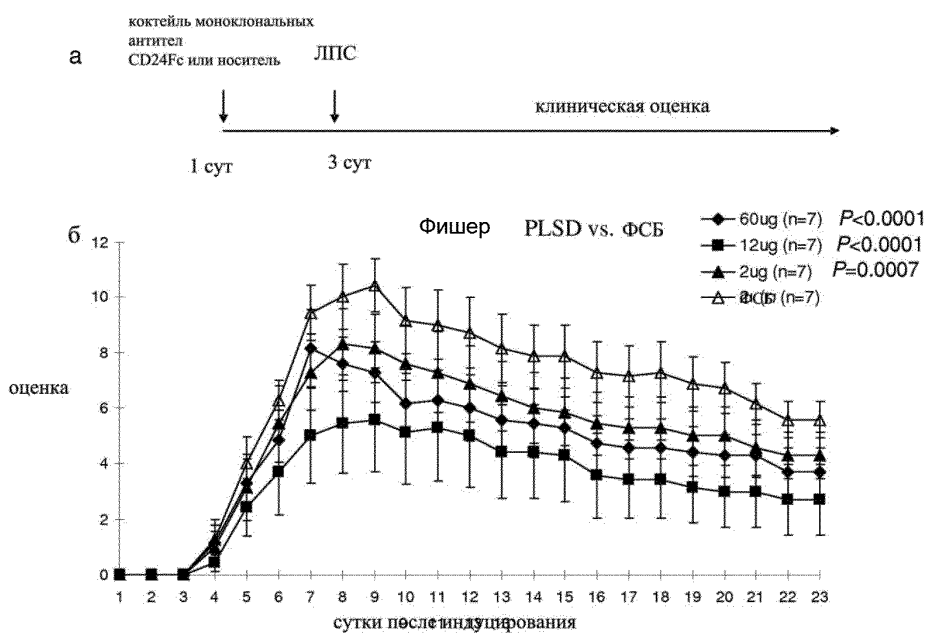


Фиг. 9

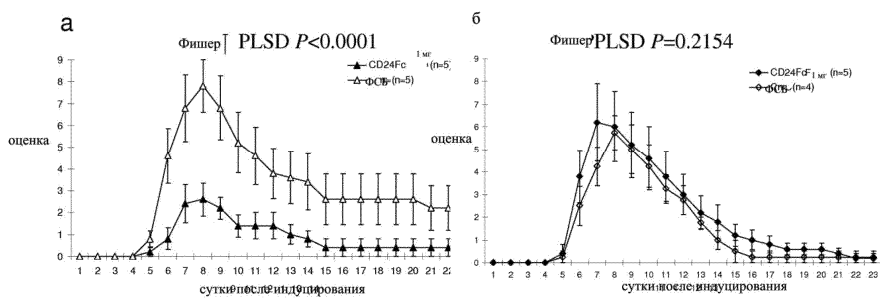


Фиг. 10

ДОЗО-ЗАВИСИМЫЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ CD24 Fc



Фиг. 11



Фиг. 12