

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 262**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2011 PCT/US2011/034282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11139820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11778000 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2563385**

54 Título: **Métodos de uso de CD24 soluble para terapia de artritis reumatoide**

30 Prioridad:

28.04.2010 US 329078 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2017

73 Titular/es:

**ONCOIMMUNE INC. (100.0%)
12111 Parklawn Drive, Suite 107
Rockville MD 20852-1707, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, XINCHENG;
WU, WEI;
LIU, YANG y
ZHENG, PAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 645 262 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de CD24 soluble para terapia de artritis reumatoide

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de artritis reumatoide.

10 **Antecedentes de la invención**

En esta sección se proporciona información sobre los antecedentes, que no son necesariamente la técnica anterior, así como un resumen general de la presente divulgación que divulga exhaustivamente de todo su alcance y de todas sus características.

15 CD24 es conocida como el antígeno termoestable (1). Se expresa como una molécula anclada por glucosil-fosfatidilinositol (GPI) (2) y tiene una amplia distribución de diferentes linajes (3). Dada la tendencia de CD24 a expresarse en células inmaduras, se ha utilizado también como parte de los marcadores de células madre y para diferenciación de linfocitos. La primera función asociada a CD24 es una actividad co-estimuladora para la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno (4-6). Los estudios *in vivo* indican que, como co-estimulador para la activación de linfocitos T en el órgano linfoide, CD24 es redundante, sin embargo pasa a ser esencial en ausencia de CD28 (7,8). Esto no se aplicaría en el caso de órganos diana locales que no son "ricos en co-estimulador". En consonancia con esta noción, los autores de la invención han demostrado que ratones con una mutación dirigida de CD24 son completamente resistentes a la inducción de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (9) (10).

25 Los polimorfismos de CD24 humana están asociados al riesgo y progresión de varias enfermedades autoinmunes (11-15), incluyendo esclerosis múltiple y artritis reumatoide (AR). En los casos de esclerosis múltiple, los autores de la invención han notificado que CD24 soluble, que consiste en la porción extracelular de CD24 murino e IgG1 Fc humana, alivió los síntomas clínicos de enfermedades autoinmunes experimentales, el modelo de ratón de esclerosis múltiple (9). En estudios más recientes de uno de los autores de la invención, se ha demostrado que CD24 interactúa y reprime la respuesta del huésped para patrones moleculares asociados a peligro (DAMP) (16).

35 AR afecta a un 0,5-1 % de la población humana. A pesar de que actualmente se dispone de una serie de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), incluso el patrón de referencia de los FARME biológicos, el conjunto de terapias dirigidas al factor de necrosis tumoral alfa, suponen un 50 % de mejora de acuerdo con los criterios de Mejora de la Universidad Americana de Reumatología (ACR50) en menos de un 50 % de los pacientes que reciben los tratamientos (17). Para AR no se dispone de cura. Por lo tanto, es necesario someter a ensayo estrategias terapéuticas adicionales para AR. Se supone que AR es una enfermedad autoinmune de las articulaciones, si bien la causa de dicha enfermedad sigue sin aclararse. En una serie de estudios se han relacionado los linfocitos T con la patogénesis de artritis reumatoide (18). Más recientemente, se ha demostrado que la transferencia de anticuerpos puede causar el desarrollo de la inflamación de las articulaciones en ratones (19-21). La patología de las lesiones se asemeja a la artritis reumatoide humana.

45 Uno de los conceptos más interesantes establecidos a partir del estudio con transferencia pasiva de AR mediante anticuerpos es que las enfermedades autoinmunes específicas de tejido se pueden observar incluso cuando los anticuerpos son específicos para proteínas que se expresan de forma ubicua (19-21). Esta noción es importante, ya que indica que, a pesar de compartir la patogénesis, las enfermedades autoinmunes para diferentes órganos/tejidos pueden requerir un tratamiento diferente. Algo que corrobora esta idea es que el interferón β , cuyo uso está muy extendido para el tratamiento de esclerosis múltiple, presenta un escaso efecto para el tratamiento de AR (22).

50 Los modelos animales pertinentes para AR humana desempeñan un importante papel para el avance del desarrollo terapéutico de los FARME. Por ejemplo, las artritis inducidas por colágeno en ratones y ratas han sido cruciales para el desarrollo de estrategias terapéuticas para AR (23). Más recientemente, se ha demostrado que la transferencia adaptativa de anticuerpos anti-colágeno causa una lesión del tipo AR robusta en ratones (19). Dado que los auto-anticuerpos son elevados en los pacientes de AR antes del inicio de la enfermedad (24, 25), la transferencia pasiva de anticuerpos específicos para colágeno es un modelo pertinente para AR humana.

60 Dado que la patogénesis de AR implica la respuesta del huésped a DAMP 26, 27) y dado que la molécula de CD24 regula negativamente la respuesta del huésped a DAMP (16), los autores de la invención investigaron el potencial del uso de CD24 soluble para tratar AR. Se seleccionó el modelo de transferencia pasiva de AR, tanto por su pertinencia para enfermedades humanas como por la sencillez de los diseños experimentales.

Sumario de la invención

65 La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a una proteína CD24 que consiste en una secuencia CD24 humana madura que consiste en la SEQ ID NO: 1, fusionada opcionalmente en el extremo C a una región Fc de una proteína inmunoglobulina (Ig) de mamífero, en la que la proteína CD24 no incluye

una alanina o una valina inmediatamente C-terminal para la SEQ ID NO: 1.

La proteína CD24 puede ser soluble o puede estar glucosilada. La proteína CD24 puede producirse utilizando un sistema de expresión de proteína eucariota. El sistema de expresión puede comprender un vector contenido en una línea celular de ovario de hámster chino o un vector retroviral defectivo en replicación. El vector retroviral defectivo en replicación puede integrarse establemente en el genoma de una célula eucariota.

Breve descripción de los dibujos

- Fig. 1. La composición de aminoácido de la proteína de fusión CD24, CD24IgG1Fc (SEQ ID NO: 5). Los 26 aminoácidos subrayados son el péptido de señal de CD24 (SEQ ID NO: 4). Los contenidos en la caja, la porción en negrita de la secuencia, es la proteína CD24 madura utilizada en la proteína de fusión (SEQ ID NO: 1). El último aminoácido (A o V) que está habitualmente presente en la proteína CD24 madura ha sido suprimido de la construcción para evitar inmunogenicidad. Las letras que no están en negrita ni subrayadas son la secuencia de IgG1 Fc, que incluye la región bisagra y los dominios CH1 y CH2 (SEQ ID NO: 6).
- Fig. 2. Métodos para la purificación y tratamiento de CD24IgG1Fc expresado desde líneas celulares de mamífero.
- Fig. 3. Variaciones de la secuencia de aminoácidos entre proteínas CD24 maduras de ratón (SEQ ID NO: 3) y ser humano (SEQ ID NO: 2). Los sitios de glucosilación potenciales están en negrita, y los sitios de N-glucosilación, en rojo.
- Fig. 4. Efecto terapéutico de CD24Ig para AR. Se inmunizaron ratones BALB/c macho de 8-10 semanas de vida, por vía intravenosa con 2 mg/ratón de un cóctel de anticuerpos de inducción de artritis, ArthritoMab, (MD bioproducts, St Paul, MN). 2 días después, se inyectaron i.p. a los ratones 90 µg de LPS disuelto en PBS. Se llevó un seguimiento del avance de la enfermedad diariamente con el siguiente sistema de puntuación. 0: sin reacción, normal; 1: enrojecimiento e hinchazón suave pero definidos en el tobillo/muñeca o aparente enrojecimiento e hinchazón limitada a los dígitos individuales, independientemente del número de dígitos afectados; 2: enrojecimiento e hinchazón moderado a severo del tobillo/muñeca; 3: enrojecimiento e hinchazón en toda la pata; 4: extremidades inflamadas de forma máxima incluyendo los dígitos afectando a varias articulaciones. Los datos que se muestran son puntuaciones compuestas de las cuatro extremidades (media ± SE). * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. La diferencia entre los dos grupos también es significativa sobre la base de la prueba PLSD de Fisher.
- Fig. 5. Análisis modelístico compartimental WinNonlin de farmacocinética de CD24IgG1. Los círculos blancos representan el promedio de 3 ratones y la línea es la curva farmacocinética pronosticada. a. inyección i.v. de 1 mg de CD24IgG1. b. inyección s.c. de 1 mg de CD24IgG. c. Comparación de las cantidades totales de anticuerpo en la sangre según la medición de áreas bajo la curva (AUC), semivida y concentración máxima en sangre. Adviértase que globalmente, la AUC y C_{max} de la inyección c.s. es aproximadamente 80 % de la inyección i.v. aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.
- Fig. 6. La interacción de CD24-Siglec G (10) discrimina PAMP y DAMP. A. La interacción de CD24-Siglec G (10) no afecta la respuesta de huésped a PAMP. B. La interacción de CD24-Siglec G (10) reprime la respuesta de huésped a DAMP, posiblemente a través de SHP-1 asociado a Siglec G/10.
- Fig. 7. Una única inyección de CD24Fc reduce la puntuación clínica de CAIA. a. Diagrama de los experimentos. Ratones BALB/c (8 semanas de vida) recibieron mAbs el día 11 en combinación con vehículo o proteínas de fusión. Se inyectó a los ratones LPS el día 3, y se los observó diariamente durante 3 semanas. b. CD24Fc reduce las puntuaciones clínicas de CAIA. Se inyectaron proteínas de fusión (1 mg/ratón) o vehículos una vez el día 1. Se determinaron las puntuaciones clínicas con ocultación doble. *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001. Se reprodujo el efecto de CD24 en 6 experimentos independientes, que implicaron un total de 52 ratones en el grupo PBS y 54 ratones en el grupo CD24Fc.
- Fig. 8. CD24Fc reduce los niveles de citoquinas inflamatorias en las articulaciones y CAIA. CAIA se inició y se trató tal como se representa en el diagrama de la Fig. 7a. Se midieron las citoquinas inflamatorias por matriz de perlas de citoquina de BD Pharmingen. a. Perfil de FACS representativo. b. Sumario de reducción de citoquinas (Media ± SE) en los homogenatos de articulaciones.
- Fig. 9. CD24Fc reduce la inflamación y la destrucción del cartílago en la articulación. El día 7, se diseccionaron las patas delanteras y traseras de ratones tratados con CD24Fc y de control, se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante 24 horas, seguido de la descalcificación con 5 % de ácido fórmico. A continuación, se embebieron las patas en parafina y se tiñó una sección longitudinal con H&E y rojo Safranina O (Sigma-Aldrich).
- Fig. 10. Efecto terapéutico de CD24Fc administrado el día 5 de la inducción de CAIA. Se repartieron al azar ratones en los que se había inducido CAIA en dos grupos, que recibieron vehículo (PBS) o CD24 Fc. Se puntuaron los ratones con doble ocultación. Se muestran los datos representativos de tres experimentos independientes.
- Fig. 11. Dosis bajas de CD24Fc previenen el desarrollo de CAIA. a. Diagrama de experimentos. b. Puntuaciones clínicas de artritis, puntuadas con doble ocultación.
- Fig. 12. Siglec-G es esencial para el efecto terapéutico de CD24Fc, ratones de tipo silvestre (a) y Siglec G -/- recibieron o bien vehículo de control o bien CD24Fc en combinación con un cóctel de mAbs anti-colágeno. Las puntuaciones clínicas se registraron diariamente con doble ocultación.

Descripción detallada

Los autores de la invención han descubierto que una forma soluble de CD24 es altamente eficaz para tratar artritis reumatoide.

5

1. Definiciones

La terminología utilizada en el presente documento sirve al propósito de describir realizaciones en particular únicamente no pretendiéndose que limite la invención. Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen los referentes en plural a no ser que el contexto lo dicte claramente de otra forma.

10

Cuando se citen intervalos numéricos en el presente documento, se contempla explícitamente cada número intermedio incluido en ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo 6-9, se contemplan los números 7 y 8, además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, y 7.0.

15

Un "péptido" o "polipéptido" es una secuencia de aminoácidos ligada y puede ser natural, sintética o una modificación o combinación de una secuencia natural y sintética.

20

"Sustancialmente idéntico" puede significar que un a primera y una segunda secuencia de aminoácidos están al menos en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % sobre una región de 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 o 300 aminoácidos.

25

"Tratamiento" o "tratar", cuando se refieren a la protección de un animal contra una enfermedad significan prevenir, suprimir, combatir o eliminar completamente la enfermedad. Prevenir la enfermedad implica la administración de una composición de la presente invención a un animal antes o al inicio de la enfermedad. Suprimir la enfermedad implica la administración de una composición de la presente invención a un animal tras la inducción de la enfermedad, pero antes de su aparición clínica. Combatir la enfermedad implica la administración de una composición de la presente invención a un animal tras la aparición clínica de la enfermedad.

30

Una "variante" puede significar un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos por inserción, deleción o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que retiene al menos una actividad biológica. Entre los ejemplos representativos de "actividad biológica" se incluyen la capacidad de unirse a un receptor de tipo toll y que unirse a través de un anticuerpo específico. Una variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que retiene al menos una actividad biológica. Normalmente, se reconoce en la técnica que una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (p.ej. hidrofilia, grado y distribución de regiones cargadas) implica un cambio menor. Dichos cambios menores pueden identificarse en parte considerando el índice hidropático de los aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobia y su carga. Es conocido dentro de la especialidad, que los aminoácidos con índices hidropáticos similares se pueden sustituir y siguen reteniendo la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofilia de los aminoácidos también se puede utilizar para revelar sustituciones que tendrían como resultado proteínas que retienen la función biológica. Considerar la hidrofilia de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite calcular el promedio de hidrofilia local máxima de un péptido, una medida útil que, según se ha notificado, está muy correlacionada con antigenicidad e inmunogenicidad, patente estadounidense. No. 4.554.101. La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede tener como resultado péptidos que retienen la actividad biológica, como por ejemplo inmunogenicidad, tal como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tienen valores de hidrofilia en torno a ± 2 entre ellos. Tanto el índice de hidrofobia como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral de dicho aminoácido en particular. En consonancia con dicha observación, se entiende que las sustituciones de aminoácido que son compatibles con la función biológica dependen de la relativa similitud de los aminoácidos y, en particular, las cadenas laterales de esos aminoácidos, según se revela por la hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades.

35

40

45

50

55

2. CD24

60

En el presente documento se proporciona una proteína CD24 que puede tener la secuencia de aminoácidos de CD24 humano maduro, que puede ser SETTTGTSSNSSQSTSNNSGLAPNPTNATTK (SEQ ID NO: 1) o SETTTGTSSNSSQSTSNNSGLAPNPTNATTK(V/A) (SEQ ID NO: 2) o CD24 de ratón, que puede ser NQTSVAPFPGNQNISASPNTNATTRG (SEQ ID NO: 3) o una variante de los mismos. CD24 puede ser soluble. CD24 puede comprender además un péptido de señal N-terminal que puede tener la secuencia de aminoácidos MGRAMVARLGLLLLLALLLPTQIYS (SEQ ID NO: 4). El CD24 puede tener también la secuencia de aminoácidos

65

que se describe en la Fig. 1 o 3. El CD24 puede existir en una o más formas alélicas, tal que el aminoácido C-terminal de CD24 humana madura puede ser una valina o una alanina. La valina o alanina C-terminal puede ser inmunógena y puede estar omitida de CD24 para reducir su inmunogenicidad. La diferencia entre los dos alelos puede afectar al riesgo de enfermedades autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple y AR. No obstante, dado que las dos formas alélicas afectan a los niveles de expresión de la forma unida a membrana, la variación no debería afectar a la función de CD24.

A pesar de las considerables variaciones de secuencia en la secuencia de aminoácidos de las proteínas CD24 maduras de ratón y ser humano, son equivalentes funcionalmente en la interacción con los patrones moleculares asociados a peligro (DAMP). Dado que la respuesta del huésped a DAMP se considera importante para la patogénesis de AR, CD24 de ratón y humana puede ser funcionalmente equivalente en el tratamiento de AR. Como resultado de la conservación de secuencia entre CD24 de ratón y humana principalmente en el extremo C y en la abundancia de sitios de glucosilación, se pueden tolerar significativas variaciones en las proteínas CD24 maduras al usar CD24 en el tratamiento de AR, especialmente si dichas variaciones no afectan a los restos conservados del extremo C o no afectan a los sitios desglucosilación de CD24 de ratón o de ser humano.

a. Fusión

CD24 se puede fusionar con su extremo N- o C-terminal con una porción de proteína Ig de mamífero, que puede ser humana o de ratón. La porción puede ser una región Fc de la proteína Ig. La región Fc puede comprender la región bisagra y dominios CH2 y CH3 de la proteína Ig. La proteína Ig puede ser IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, o IgA humana. La porción Fc puede comprender la SEQ ID NO: 6. La proteína Ig también puede ser IgM, y la porción Fc puede comprender la región bisagra y los dominios CH3 y CH4 de IgM. CD24 puede fusionarse también en su extremo N- o C- con la etiqueta de proteína que puede ser GST, His o FLAG. Los métodos para fabricar proteínas de fusión y purificar proteínas de fusión son muy conocidos en la técnica.

b. Producción

Es posible glucosilar CD24 potentemente y puede participar en funciones de CD24 como co-estimulación e interacción con patrones moleculares asociados a peligro. Se puede preparar CD24 utilizando un sistema de expresión eucariota. El sistema de expresión puede entrañar la expresión desde un vector en células de mamífero, como por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO). El sistema también puede ser un vector viral, como por ejemplo un vector retroviral defectivo en replicación, que se puede utilizar para infectar células eucariotas. Asimismo, se puede producir CD24 a partir de una línea celular estable que expresa CD24 desde un vector o una porción de un vector que ha sido integrado en el genoma celular. La línea celular estable puede expresar CD24 desde un vector retroviral defectivo en replicación integrado. El sistema de expresión puede ser GPEx™.

3. Método de tratamiento

Se puede utilizar CD24 para tratar artritis reumatoide. Se puede administrar CD24 a un paciente que lo necesita. El paciente puede ser un mamífero, como pueda ser un ser humano.

a. Terapia de CD24 combinada

Se puede combinar CD24 con otro fármaco, como por ejemplo un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FARME). El fármaco puede ser un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINEI), que puede ser un derivado de ácido propiónico, un derivado de ácido acético, un derivado de ácido enólico, un derivado de ácido fenámico o un inhibidor Cox2 selectivo. El fármaco también puede ser un corticoesteroide o metotrexato. El fármaco también puede ser biológico, que puede ser un antagonista de TNF- α , como anticuerpo anti-TNF- α , o una proteína de fusión que se une a TNF- α (Enbrel), un mAb anti-CD20, un antagonista de molécula co-estimuladora CD80 y CD86, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión (CTLA4lg) que se une a las dos moléculas, o un antagonista para el receptor de IL-1 o IL-6. CD24 y el otro fármaco se pueden administrar en combinación o se forma secuencial.

b. Composición farmacéutica

CD24 puede estar contenido en una composición farmacéutica que puede comprender un disolvente, que puede mantener estable CD24 durante un extenso período de tiempo. El disolvente puede ser PBS, que puede mantener estable CD24 durante al menos 36 meses, a -20 °C (-15~-25°C). El disolvente puede ser capaz de acomodar el CD24 en combinación con el otro fármaco.

c. Posología

La posología determinada para un ser humano puede ser determinada en última instancia mediante ensayos clínicos para determinar una dosis con una toxicidad aceptable y una eficacia clínica. La dosis clínica inicial para un ser humano puede estimarse a través de estudios de farmacocinética y toxicidad en roedores y primates no humanos.

La dosis de CD24 puede ser de 0,01 mg/kg a 1000mg/Kg, y puede ser de 1 a 500 mg/kg, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se está tratando y la ruta de administración.

d. Administración

La ruta de administración de la composición farmacéutica puede ser parenteral. La administración parenteral incluye, pero sin limitarse a ellas, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal, intraarticular e inyección directa de las articulaciones afectadas. Para su uso veterinario, el agente puede administrarse como una formulación aceptable adecuada de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario podrá determinar fácilmente la posología y la ruta de administración que sea más apropiada para un animal en particular. La composición farmacéutica puede administrarse a un paciente humano, un gato, un perro, animales grandes o un ave.

CD24 se puede administrar simultáneamente o de forma metronómica con otros tratamientos. El término "simultáneo" o "simultáneamente" tal como se utiliza en el presente documento significa que CD24 y otro tratamiento se pueden administrar en el transcurso de 48 horas, preferentemente 24 horas, más preferentemente 12 horas, más preferentemente aún 6 horas, siendo lo más preferente 3 horas o menos, uno del otro. El término "metronómico" tal como se utiliza en el presente documento significa la administración del agente en momentos diferentes un tratamiento del otro y a una frecuencia determinada en relación con la administración repetida.

CD24 puede administrarse en cualquier momento puntual antes de otro tratamiento incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min., 50 min., 45 min., 40 min., 35 min., 30 min., 25 min., 20 min., 15 min., 10 min., 9 min., 8 min., 7 min., 6 min., 5 min., 4 min., 3 min., 2 min., y 1 min. CD24 se puede administrar en cualquier momento puntual antes de un segundo tratamiento de CD24 incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min., 50 min., 45 min., 40 min., 35 min., 30 min., 25 min., 20 min., 15 min., 10 min., 9 min., 8 min., 7 min., 6 min., 5 min., 4 min., 3 min., 2 min., y 1 min.

CD24 se puede administrar en cualquier momento puntual después de otro tratamiento incluyendo aproximadamente 1min, 2 min., 3 min., 4 min., 5 min., 6 min., 7 min., 8 min., 9 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min., 30 min., 35 min., 40 min., 45 min., 50 min., 55 min., 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h, 32 h, 34 h, 36 h, 38 h, 40 h, 42 h, 44 h, 46 h, 48 h, 50 h, 52 h, 54 h, 56 h, 58 h, 60 h, 62 h, 64 h, 66 h, 68 h, 70 h, 72 h, 74 h, 76 h, 78 h, 80 h, 82 h, 84 h, 86 h, 88 h, 90 h, 92 h, 94 h, 96 h, 98 h, 100 h, 102 h, 104 h, 106 h, 108 h, 110 h, 112 h, 114 h, 116 h, 118 h y 120 h. CD24 se puede administrar en cualquier momento puntual después de un tratamiento previo de CD24 incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min., 50 min., 45 min., 40 min., 35 min., 30 min., 25 min., 20 min., 15 min., 10 min., 9 min., 8 min., 7 min., 6 min., 5 min., 4 min., 3 min., 2 min., y 1 min.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Ejemplo 1

Proteínas CD24 solubles

Se fusionó el dominio extracelular de CD24 con IgG1 Fc. En la Fig. 1 se proporciona la composición de aminoácidos de la proteína de fusión de CD24. A continuación, se generó un vector retroviral defectivo en replicación que acciona la expresión de la proteína de fusión CD24Ig. El sistema GPEX™ (acrónimo en inglés de expresión de producto génico) ofrece varias ventajas importantes, siendo la más importante de ellas un promedio de >1000 inserciones/célula, pero solamente con 1 copia/inserción. Por otra parte, dado que el retrovirus se inserta preferentemente en el locus activo transcripcional, GPEX™ tuvo como resultado un alto nivel de expresión de la proteína dirigida. Se generaron líneas celulares estables que producen un alto rendimiento de CD24Ig. Asimismo, se produjeron 45 gramos de productos de calidad BPL y ~100 gramos de productos de calidad BPL. Los métodos utilizados para el tratamiento corriente abajo de los medios cosechados desde el biorreactor se compendian en el diagrama de flujo más adelante (Fig. 2).

Aclarado de cosecha

Se aclaró el medio de cultivo del biorreactor utilizando filtros de profundidad Cuno 60M02 Maximizer seguido de un filtro de 0,22 um Opticap de Millipore. Se recogió el filtrado en una bolsa colectora estéril. Se obtuvieron muestras

para determinar el rendimiento de CD24-Fc por ELISA.

Captura de proteína A

5 Se pasó el medio aclarado sobre una columna de resina de Proteína A (GE Healthcare MabSelect) a una concentración no superior a 16 g/l de resina (basado en ELISA) y un período de contacto de 4 minutos. Se lavó la columna con el tampón de equilibrio (50 mM Tris + 0,15 M NaCl pH 7,5), después con 10 mM citrato sódico /ácido cítrico pH 6,0 durante 5 cvs. Se eluyó CD24Ig unida de la columna utilizando 10 mM citrato sódico /ácido cítrico, pH 3,5.

10

Inactivación viral

15 Se llevó inmediatamente la fracción del eluato de Proteína A a un pH 3,0 con la adición de 2M ácido clorhídrico y se mantuvo a este pH durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a un pH 5,0 con la adición de 1M Tris base, y se filtró para el aclarado utilizando un filtro de fibra de vidrio de 0,65 μ m (Sartorius Sartopure GF2) y 0,2 μ m (Sartorius Sartopore 2), introduciéndolos en una bolsa colectora estéril.

Cromatografía con SP-Sepharose

20 Se aplicó el material inactivado viral a una columna de SP-Sepharose (GE Healthcare) a una concentración no superior a 25 g/l de resina (basado en A280 nm de 1,22 = 1 mg/ml) y un caudal lineal de 250 cm/h. Se lavó la columna con el tampón de equilibrio (10 mM citrato sódico / ácido cítrico, pH 5,0) y se eluyó el CD24Ig unido de la columna utilizando 10 mM citrato sódico / ácido cítrico + 0,2 M NaCl, pH 5,0. Se recogió el efluente en una bolsa colectora estéril.

25

Cromatografía con Mustang Q

30 Se ajustó el eluato de SP-Sepharose a pH 7,5 por adición de 1M Tris base y se diluyó con agua para inyectables para reducir la conductividad. Se aplicó el material diluido a una carga de Mustang Q (Pall) a una concentración no superior a 0,5 g/l de resina (basado en A280 nm de 1,22 = 1 mg/ml) y a un caudal de 5 volúmenes de columna / minuto. Se lavó el filtro con un tampón de equilibrio (10 mM Tris, pH 7,5) y se recogió el CD24-Fc contenido en el flujo en una bolsa colectora estéril.

35

Filtración viral

A continuación, se filtró la resina Mustang Q a una presión constante de 30 psi (207 kPa) a través de un filtro de 0,2 mM y un filtro viral NFP de Millipore (tamaño de poro nominal 20 nm) y se recogió en una bolsa colectora estéril.

40

Concentración y formulación final

45 Se concentró el producto y se diafiltró utilizando una membrana de ultrafiltración de 10 kDa (Millipore Prep/Scale) en 10 mM fosfato sódico, 150 mM cloruro sódico, pH 7,2 a aproximadamente 10 mg/ml de concentración final, según se determina por la absorbancia a 280 nm. Se extrajeron muestras para análisis del volumen mientras se encontraba en una cabina de bioseguridad. Se realizó el marcado y se enviaron las muestras a CC para su análisis al mismo tiempo que se almacenaban partes alícuotas en volumen a 2-8 °C en espera de liberación.

Estudios de aclaramiento viral

50 Se llevó a cabo el aclaramiento viral en Cardinal Health, Carolina del Norte, en las muestras preparadas en CHM. Investigadores cualificados de Gala Biotech llevaron a cabo las etapas de cromatografía y filtración en las instalaciones de validación viral de Cardinal Health con la ayuda del personal de Cardinal Health. Se desarrolló el procedimiento a menor escala a partir del proceso a una escala de 200 l. Se seleccionaron dos virus para su uso en el estudio. El primero de ellos fue el virus de la leucemia murina xenotrópica (XMuLv), que es un virus de ARN con envoltura de 80-130 nm de tamaño, de la familia viral de los *Retroviridae*. El segundo fue parvovirus porcino (PPV), que es un virus de ADN sin envoltura de 18-26 nm de tamaño, que se considera un virus robusto y, según lo esperado, debía demostrar una reducción viral mucho menor a través del protocolo de purificación que el virus XMuLv.

Ejemplo 2

60

Uso de CD24Fc para terapia de AR

65 Este ejemplo demuestra que se puede utilizar CD24 para tratar AR. Dado que en los pacientes de AR están presentes anticuerpos anti-colágeno antes del inicio de la enfermedad y, dado que los anticuerpos anti-colágeno son capaces de inducir una patología de tipo AR en los ratones, se utilizó el modelo de transferencia pasiva de AR establecido para determinar la eficacia de CD24 soluble. Se disolvió la proteína de fusión en vehículo PBS a 10

mg/ml. Tal como se muestra en la Fig. 4, la combinación de 4 anticuerpos anti-colágeno causó varios síntomas clínicos en todas las extremidades que alcanzaron el máximo el día 7 tanto en los grupos tratados con vehículo como los tratados con CD24Fc. La enfermedad se caracterizó por un enrojecimiento e hinchazón en toda la pata en todas las extremidades. Algunas extremidades se inflamaron máximamente, afectando a los dígitos y a varias articulaciones. Por lo tanto, la proteína soluble no afecta al inicio de la enfermedad. Sorprendentemente, el grupo tratado con CD24Fc presentó una recuperación mucho más rápida. Las reducciones de las puntuaciones clínicas son muy significativas a partir del día 9 y se mantienen durante todo el período de observación de 24 días. Por lo tanto, CD24Fc proporciona un tratamiento eficaz para AR. Cabe destacar que dado que se observa el efecto cuando la enfermedad alcanza su punto máximo, es probable que el bloqueo de CD24 afecte al proceso de enfermedad crónica tras el inicio de la inflamación.

Ejemplo 3

Farmacocinética de CD24

Se inyectó 1 mg de CD24IgG1 en ratones C57BL/6 sin tratar previamente y se recogieron muestras de sangre en diferentes puntos en el tiempo (5 min, 1 h, 4 h, 24 h, 48 h, 7 días, 14 días y 21 días) con 3 ratones en cada punto en el tiempo. Se diluyeron los sueros 1:100 y se detectaron los niveles de CD24Ig aplicando ELISA sándwich utilizando CD24 anti-humano purificado (3,3 µg/ml) como anticuerpo de captura e IgG Fc anti-humana de cabra conjugada con peroxidasa (5 mg/ml) como anticuerpos de detección. Tal como se muestra en la Fig. 5a, la curva de caída de CD24Ig reveló una típica caída bifásica de la proteína. La primera fase de biodistribución tuvo una semivida de 12,4 horas. La segunda fase siguió un modelo de eliminación de primer orden desde el compartimento central. La semivida para la segunda fase fue 9,45 días, que es similar a la de los anticuerpos *in vivo*. Estos datos indican que la proteína de fusión es muy estable en la corriente sanguínea. En otro estudio en el que se inyectó subcutáneamente la proteína de fusión, se observó una semivida prácticamente idéntica de 9,52 días (Fig. 5b). Cabe destacar sobre todo que mientras CD24Ig requirió aproximadamente 48 horas para alcanzar los niveles máximos en la sangre, la cantidad total de proteína de fusión en la sangre, según se mide por AUC, fue sustancialmente la misma para cualquiera de las rutas de inyección. Por lo tanto, desde el punto de vista terapéutico, la ruta de inyección diferente no debería afectar al efecto terapéutico del fármaco. Esta observación simplificó enormemente el diseño experimental para los ensayos de toxicidad y clínicos con primates.

Ejemplo 4

CD24 para tratar AR

Durante décadas, se ha dado por supuesto que AR es predominantemente una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T. En las últimas dos décadas, se ha reavivado la idea del posible papel de anticuerpos y linfocitos B en la patogénesis de AR. Por lo tanto, además de los factores reumatoides, se han encontrado multitud de anticuerpos autorreactivos en los pacientes de AR, si bien no se han abordado de forma definitiva en el ser humano. No obstante, varias líneas de evidencia han demostrado que en los modelos de ratón, los anticuerpos específicos tanto para antígenos ubicuos como específicos de tejido son suficientes para causar síntomas de AR. Por ejemplo, se observó que los anticuerpos de ratones transgénicos K/BxN TCR son totalmente capaces de transferir enfermedades de tipo AR en el nuevo huésped. Igualmente, actualmente, está extendido el uso de un coctel para 4 anticuerpos anti-colágeno para inducir AR en ratones. Este modelo se denomina CAIA, por sus siglas en inglés, artritis inducida por anticuerpo para colágeno.

Los análisis genéticos del modelo CAIA indican el papel crucial del complemento. Aunque existen otras posibilidades, dicho requerimiento indica la posible implicación del daño de tejido mediado por anticuerpos en la patogénesis de AR. La vinculación entre el daño de tejido y la inflamación es un hecho observado desde hace tiempo en inmunología. Hace casi dos décadas, Matzinger propuso lo que se ha llamado popularmente teoría del peligro. Básicamente, sostenía que el sistema inmune se enciende cuando detecta el peligro para el huésped. Si bien en ese momento no se definió claramente la naturaleza del peligro, se ha determinado que la necrosis está asociada a la liberación de componentes intracelulares, como HMGB1 y proteínas de choque térmico, que se denominaron DMAP, patrones moleculares asociados a peligro. Se observó que los DAMP promovían la producción de citoquinas inflamatorias y enfermedades autoinmunes. En modelos animales, se observó que los inhibidores de HMGB1 y HSP90 mejoraban AR. La implicación de DAMP elevó la perspectiva de poderse explorar la regulación negativa para la respuesta del huésped a DAMP para terapia de AR.

Interacción de CD24-Siglec 10 en la respuesta de huésped a lesiones de tejido

Utilizando necrosis de hígado inducida por acetaminofeno y comprobando la inflamación, se observó que a través de la interacción con Siglec G, CD24 proporciona una regulación potentemente negativa para la respuesta del huésped a lesiones de tejido. CD24 es una molécula de anclaje GPI que se expresa ampliamente en células hematopoyéticas y otras células madre del tejido. Los análisis genéticos de diversas enfermedades autoinmunes en seres humanos, entre las que se incluyen esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, AR y artritis de célula gigante, presentaron una significativa asociación entre el polimorfismo de CD24 y el riesgo de enfermedades autoinmunes. Siglec G es u

miembro de la familia de las lectinas 1, definida por su capacidad para reconocer estructuras que contienen ácido siálico. Siglec G reconoce estructuras que contienen ácido siálico sobre CD24 y regula negativamente la producción de citoquinas inflamatorias a través de células dendríticas (16). En lo que se refiere a la capacidad para interactuar con CD24, Siglec 10 humano y Siglec G de ratón son funcionalmente equivalentes. No obstante, no está aclarado si existe una correlación uno a uno entre los homólogos de ratón y ser humano. A pesar de que no se ha elucidado el mecanismo completamente, es posible que SHP1 asociado a Siglec G participe en la regulación negativa. Estos datos, notificados en Science recientemente, conducen a un nuevo modelo en el que la interacción CD24/siglec G/10 puede desempeñar un papel crucial en la discriminación del patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) de DAMP (Fig. 6).

Al menos dos mecanismos solapados pueden explicar la función de CD24. En primer lugar, al unirse a diversos DMAP, CD24 puede atrapar los estímulos inflamatorios para prevenir su interacción con TLR o RAGE. Esta noción está corroborada por el hecho de que se ha observado que CD24 se asocia con varias moléculas DAMP, incluyendo HSP70, 90, HMGB1 y nucleolina. En segundo lugar, tal vez tras la asociación con DMAP, es posible que CD24 estimule la señalización mediante Siglec G. Ambos mecanismos pueden actuar conjuntamente, ya que los ratones con la mutación dirigida de cualquiera de los genes supuso una respuesta inflamatoria mucho más fuerte. De hecho, DC cultivado de médula ósea de ratones CD24^{-/-} o Siglec G^{-/-} produjo citoquinas mucho más inflamatorias cuando se estimuló con HMGB1, HSP70 o HSP90. En cambio, no se observó ningún efecto en su respuesta a PAMP, como por ejemplo LPS y Polil: C. Estos datos no solamente proporcionaron un mecanismo para el sistema inmune innato para distinguir patógeno de la lesión de tejido, sino que también indicaron CD24 y Siglec G como posibles dianas terapéuticas para enfermedades asociadas a lesiones de tejido.

Efecto terapéutico de CD24Fc sobre artritis inducida por anticuerpo para colágeno

Dado el presunto papel de la inmunidad innata para lesión de tejido en la patogénesis de AR y el papel para la ruta de CD24-Siglec G/10 para regular negativamente dicha respuesta, se exploró la posibilidad de estimular esta ruta para tratar AR. La patogénesis de esencialmente todas las enfermedades autoinmunes implica la inducción de la respuesta inmune al autoantígeno y la destrucción autoinmune. Se puso el centro de atención en la fase destructiva autoinmune sobre la base de la nueva función de la interacción CD24-Siglec G. Por consiguiente, para el análisis preliminar, se adoptó un modelo de artritis inducida por anticuerpo para colágeno para evaluar el potencial del efecto terapéutico.

Tal como se muestra en la Figura 7a, se indujo CAIA en ratones BALB/c de 8 semanas de vida por inyección i.v. de un cóctel de 4 mAbs anti-colágeno (MD Biosciences, St. Paul, MN) a 2 mg/ratón el día 1, e inyección i.p. de 100 mg/ratón de LPS (MD Bioscience) el día 3. Se trató a los ratones el día 1 con 1 mg de CD24Fc o con un volumen equivalente de 1 x vehículo PBS como control negativo. Tal como se muestra en la Fig. 7b, en comparación con el control de vehículo, CD24Fc proporcionó un efecto terapéutico significativamente alto.

Para comprender el mecanismo en virtud del cual CD24Fc reduce la artritis en este modelo, se midieron las citoquinas de articulaciones homogenizadas de ratones tratados con CD24Fc o el grupo de control tratado con PBS, y se midió el sobrenadante de 200 µg de homogenatos de tejido con matriz de perlas de citoquina. En la Fig. 8a, se muestra un ejemplo típico, mientras que en la Fig. 8b se muestra el resumen de los datos. Estos datos demuestran que CD24 administrado de forma sistemática reduce los niveles de múltiples citoquinas inflamatorias incluyendo TNF-α, IL-6, MCP-1(CCL2) e IL-1β.

El efecto de CD24Fc se sustancia por análisis histológico de las articulaciones sinoviales de ratones CAIA, tal como se presenta en la Fig. 9. El día 7 tras la inducción de artritis, la tinción con H&E demostró que la sinovia de las articulaciones en el grupo PBS estaban fuertemente infiltradas con células inflamatorias, incluyendo neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Fig. 9a). Esto se redujo en gran medida en los ratones tratados con CD24Fc (Fig. 9b). Por otra parte, se revelaron varias lesiones graves en el cartílago por la pérdida de la señal de rojo de safranina en los ratones tratados con PBS (Fig. 9c), no siendo así en el grupo tratado con CD24Fc- (Fig. 9d).

Para determinar si CD24Fc tenía o no efecto terapéutico en AR crónica en ratones, se comenzó el tratamiento a los 5 o 7 después de la inducción de AR. Tal como se muestra en la Fig. 10, se observó una significativa reducción de la puntuación de AR, tan solo a los dos días del tratamiento con CD24Fc. El efecto terapéutico duró el resto del período de observación incluso sin un tratamiento adicional. Estos datos refuerzan aún más el potencial terapéutico de CD24Fc en enfermedades crónicas.

Para estimar las dosis terapéuticas de CD24F en seres humanos, se tituló CD24Fc a través de un amplio abanico de dosis. Tal como se muestra en la Fig. 11, es suficiente tan solo 2 microgramos/ratón para conseguir un efecto terapéutico estadísticamente significativo.

Efecto terapéutico de CD24Fc dependiente de Siglec G

Para determinar si CD24Fc protege ratones por interacción con Siglec-G, se determinó si el efecto terapéutico dependía del gen Siglec-G. Dado que los ratones con deficiencia en Siglec-G se produjeron con células ES de

ratones C57BL/6, se utilizaron ratones de tipo silvestre C57BL/6 como control. Tal como se muestra en la Fig. 12a, dado que se sabe que los ratones B6 son menos susceptibles a CAIA, la puntuación de la enfermedad global es inferior a la observada en los ratones BALB/c. No obstante, una sola inyección de CD24Fc eliminó esencialmente los signos clínicos en los ratones de tipo silvestre. Cabe destacar que incluso aunque la enfermedad fuera menos grave en los ratones con deficiencia en Siglec-G, CD24Fc no tuvo efecto terapéutico. Por lo tanto, el efecto terapéutico de CD24Fc depende estrictamente del gen Siglec-G.

En conjunto, los datos descritos en el presente documento demuestran una alta eficacia terapéutica de CD24Fc para CAIA. Dada la exhaustividad de los datos sobre la seguridad, estabilidad y fabricación con éxito de CD24Fc se puede afirmar el gran potencial de la proteína de fusión como estrategia terapéutica para AR.

Ejemplo 5

Toxicidad

Los exhaustivos estudios sobre toxicidad de roedores y primates no humanos han demostrado la falta de toxicidad relacionada con fármaco a una posología de 12,5 a 125 mg/kg en ratón y primates no humanos.

REFERENCIAS CITADAS

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. Marics, C. Devaux, M. Barad, R. Hyman, and G. Rougon. 1987. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J11d 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 hematology 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 Estados Unidos* 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. Emparanza, and A. López 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-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.
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 dinucleotide 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

ES 2 645 262 T3

<210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (31)..(31)
 <223> Val o Ala
 10
 <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
 15
 <210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20
 <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
 25
 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <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
 35
 <210> 5
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Fusión CD24 humana IgG1 Fc
 <400> 5

ES 2 645 262 T3

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

ES 2 645 262 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 85 90 95

10

ES 2 645 262 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína CD24 que consiste en una secuencia CD24 humana madura que consiste en SEQ ID NO: 1, fusionada opcionalmente en el extremo C con una región Fc de una proteína inmunoglobulina (Ig) de mamífero, en donde la proteína CD24 no incluye una alanina o una valina inmediatamente C-terminal en la SEQ ID NO: 1.
2. La proteína CD24 de la reivindicación 1, en donde la proteína CD24 es soluble.
- 10 3. La proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la proteína CD24 está glucosilada.
4. La proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la porción Fc de la Ig de mamífero se fusiona en el extremo C de CD24 maduro.
- 15 5. La proteína CD24 de la reivindicación 4, en donde la proteína Ig es humana.
6. La proteína CD24 de la reivindicación 5, en donde la porción Fc consiste en la región bisagra y los dominios CH2 y CH3 de la proteína Ig humana y en donde la Ig se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA.
- 20 7. La proteína CD24 de la reivindicación 5, en donde la porción Fc comprende una región bisagra y los dominios CH3 y CH4 de IgM.
8. La proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la proteína CD24 se produce utilizando un sistema de expresión de proteínas eucariotas.
- 25 9. La proteína CD24 de la reivindicación 8, en donde el sistema de expresión comprende un vector contenido en una línea celular de ovario de hámster chino o un vector retroviral defectivo en replicación.
- 30 10. La proteína CD24 de la reivindicación 9, en donde el vector retroviral defectivo en replicación está integrado establemente en el genoma de una célula eucariota.
11. La proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 8-10, que consiste en la SEQ ID NO: 1 fusionada en el extremo C con la región bisagra y los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana.
- 35 12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un disolvente.
- 40 13. Una proteína CD24 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide.

FIGURA 1

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNGLAP**
NFTNATTKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVHLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 2

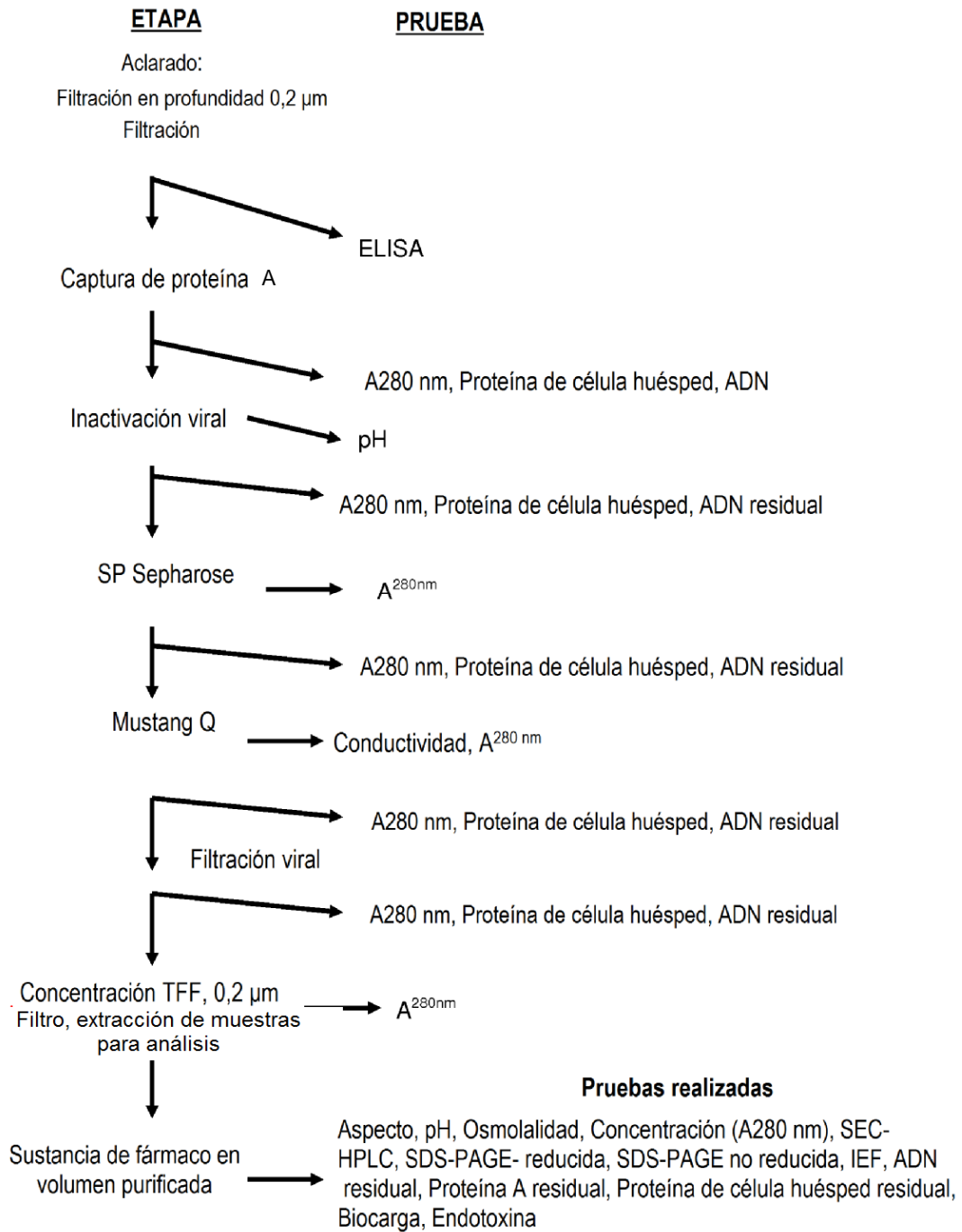


FIGURA 3

Ratón	cd24	NQTSVAPFPGN--QNISAS-----PNPTNATTRG
		—* — * * * * * * * * * * * * —
Humano	CD24	SETTTGTSS--SSQSTSN--GLAPNPTNATTKA (V)

FIGURA 4

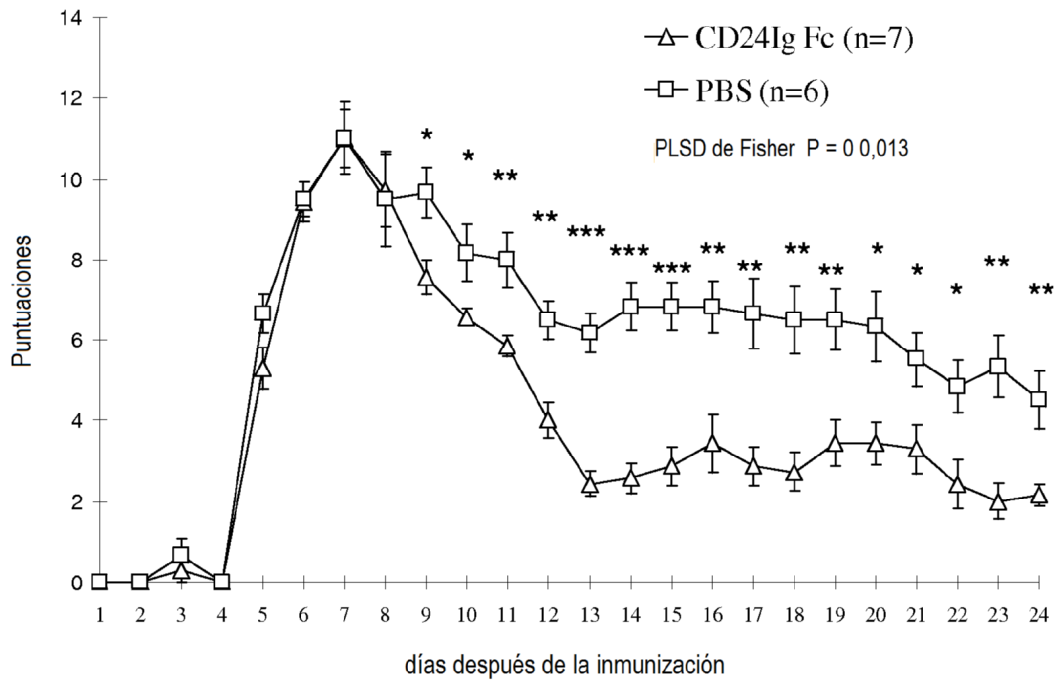


FIGURA 5

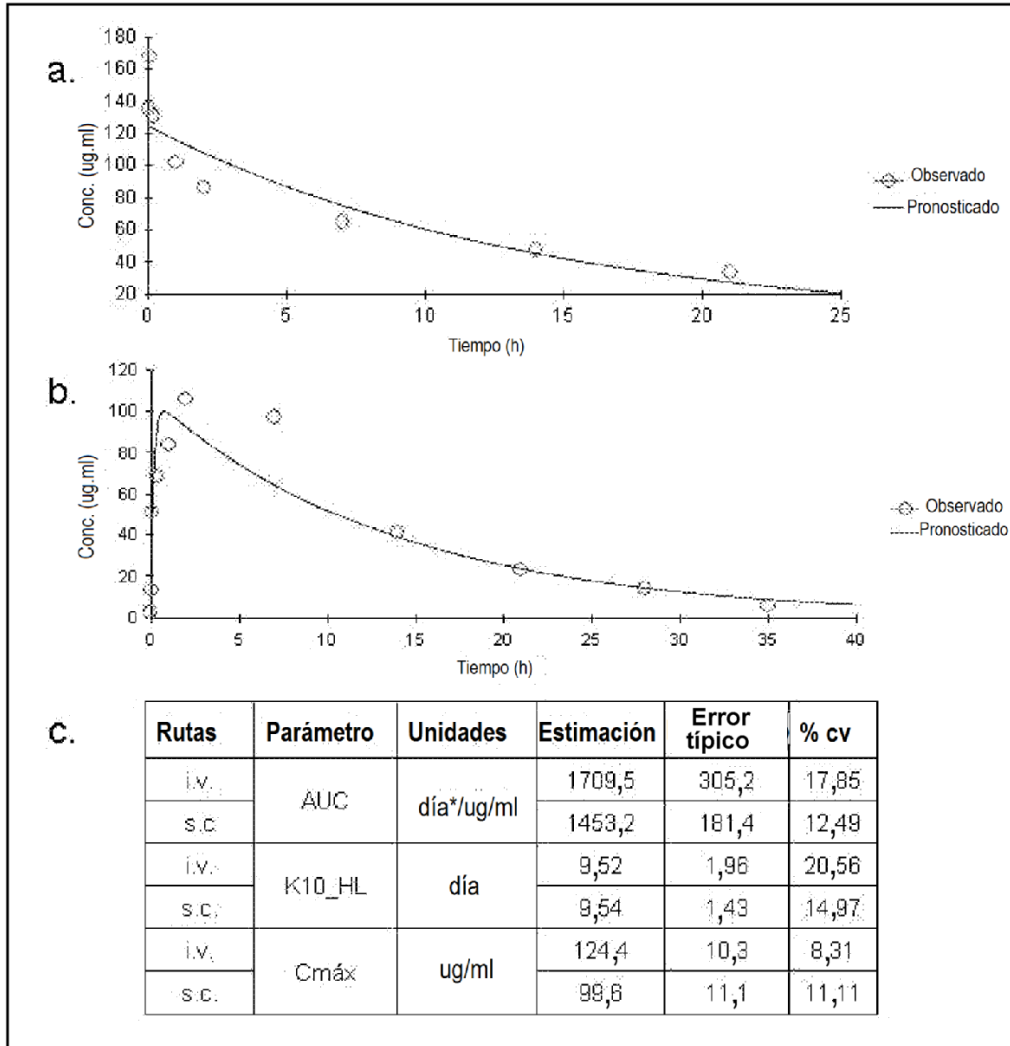


FIGURA 6

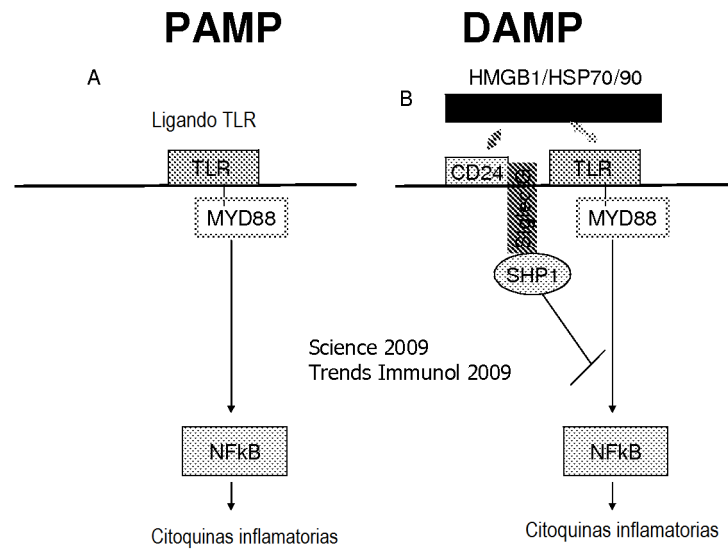


FIGURA 7

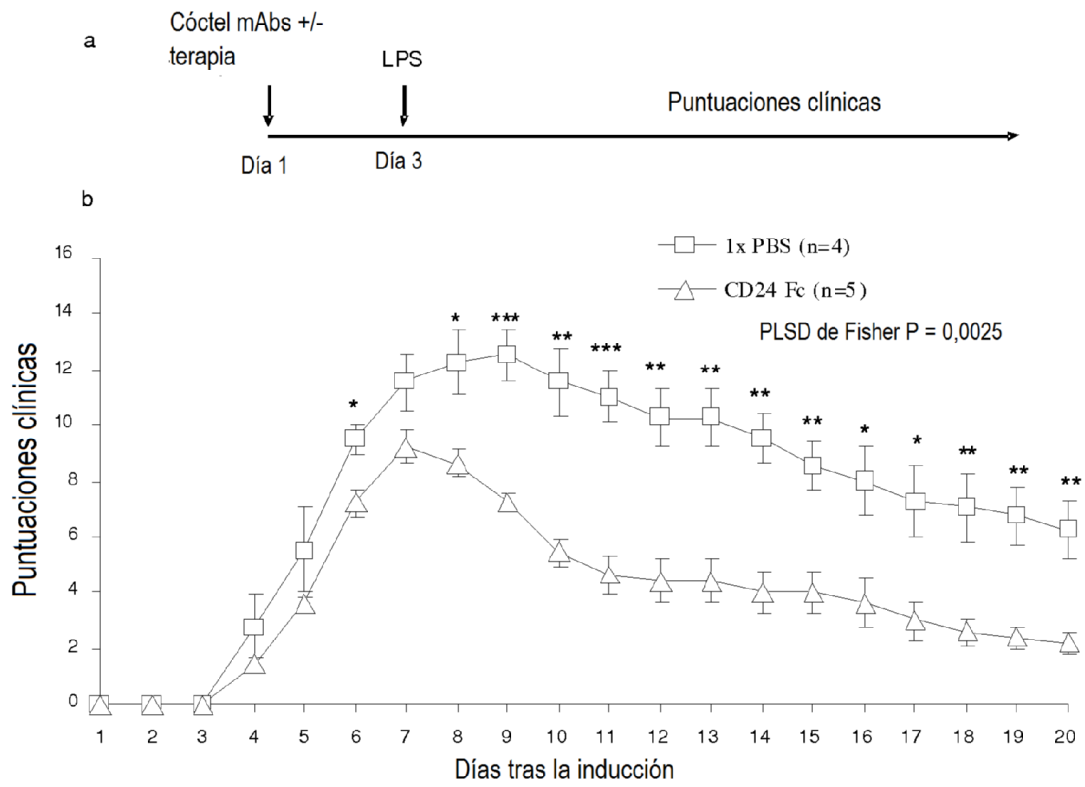


FIGURA 8

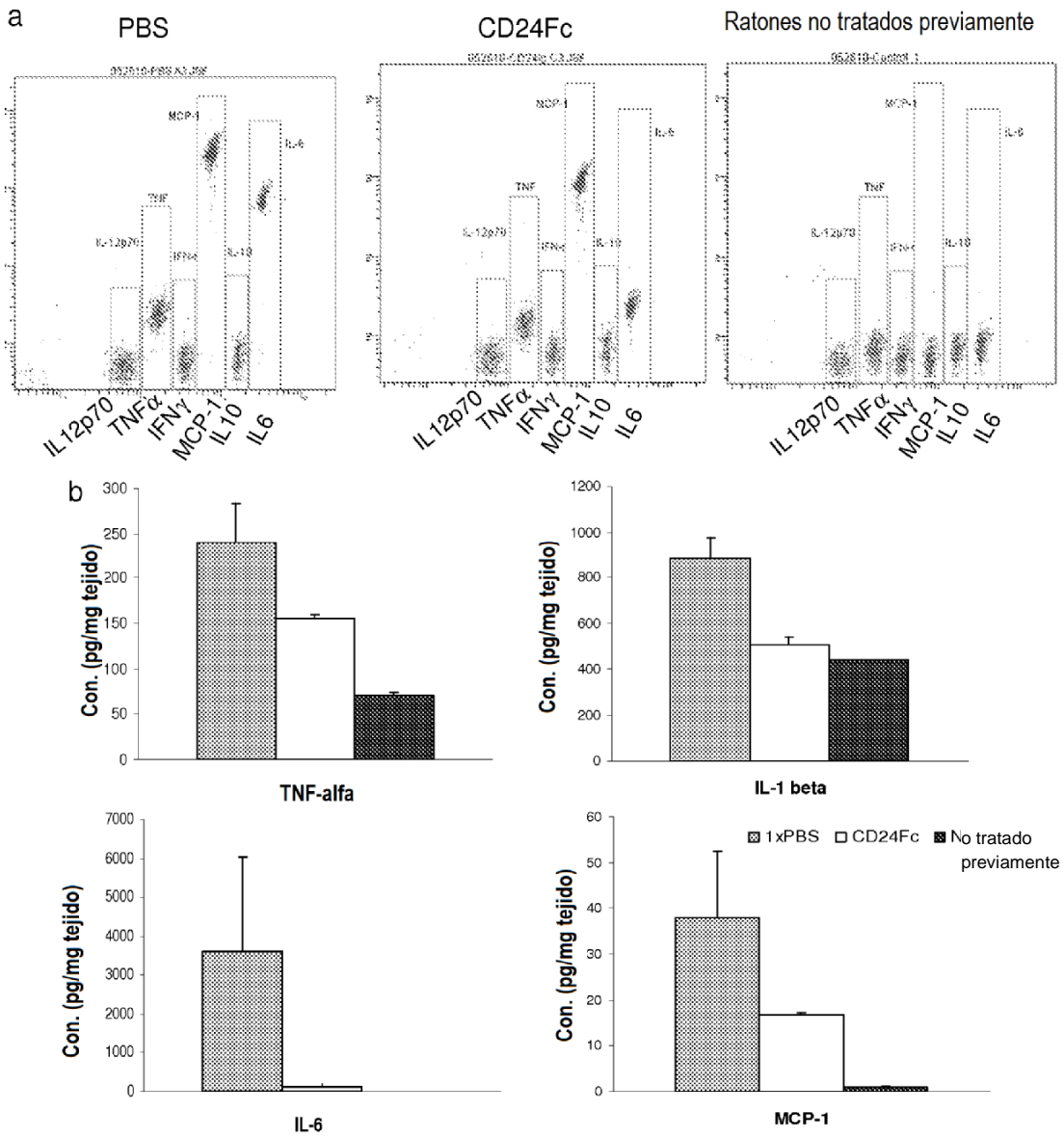


FIGURA 9

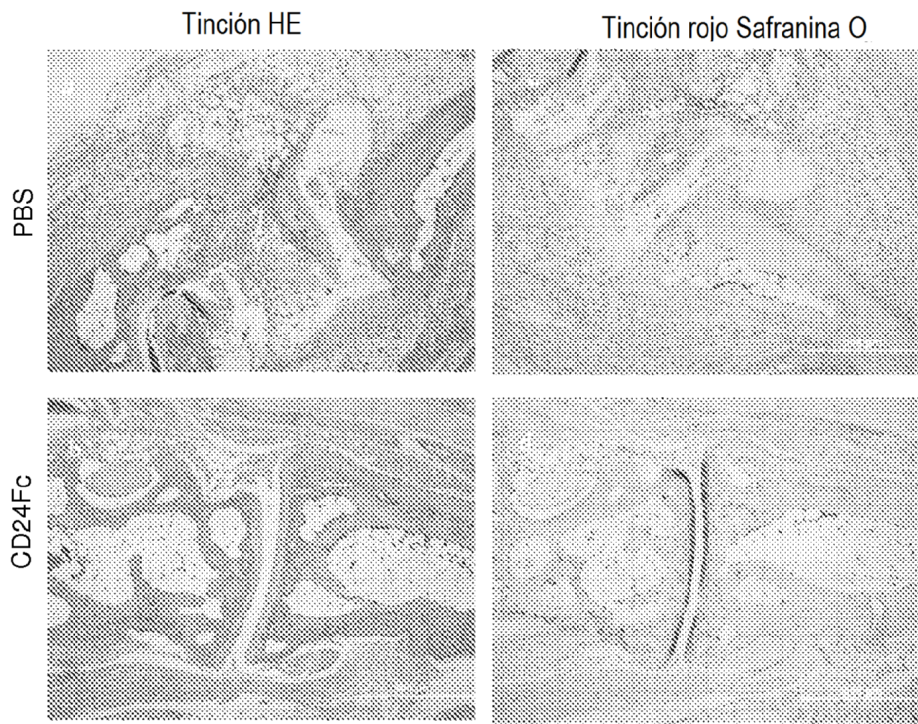


FIGURA 10

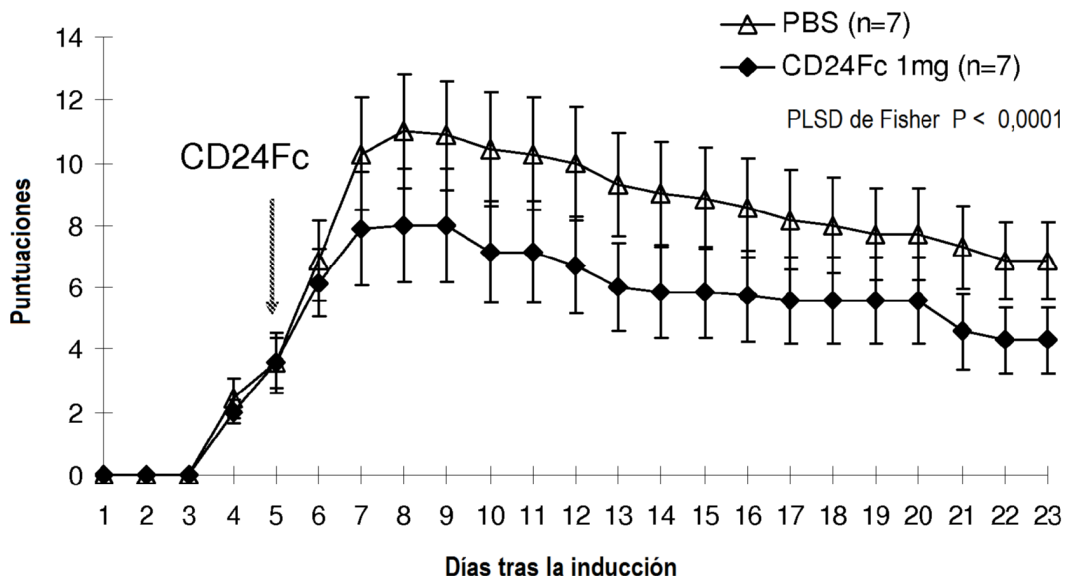


FIGURA 11

Efecto terapéutico de CD24F dependiente de la dosis

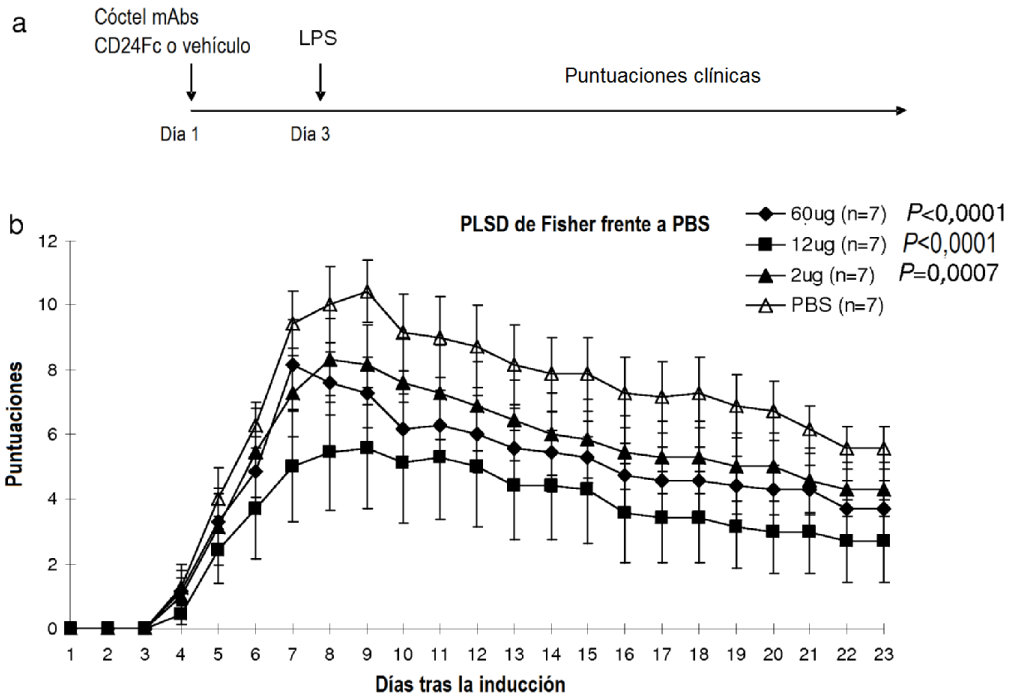


FIGURA 12

