

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/31
A61K 39/108
G01N 33/53

(45) 공고일자 2002년07월02일
(11) 등록번호 10-0328112
(24) 등록일자 2002년02월27일

(21) 출원번호	10-1998-0707257	(65) 공개번호	특 1999-0087777
(22) 출원일자	1998년09월 14일	(43) 공개일자	1999년 12월 27일
번역문제출일자	1998년09월 14일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/02957	(87) 국제공개번호	WO 1997/34002
(86) 국제출원일자	1997년02월20일	(87) 국제공개일자	1997년09월 18일
(81) 지정국	국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그 루지아 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국		

(30) 우선권주장	08/618,464 1996년03월 15일 미국(US)
(73) 특허권자	더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 린다 에스. 스티븐슨 미국 94612 캘리포니아주, 오콜랜드, 레이크사이드 드라이브 300, 투웬티퍼 스트 플로어
(72) 발명자	칼슨 데니스 에이. 미국 캘리포니아 92014 델 마르 비스타 델 오세아노 14824 알바니 살바토르
(74) 대리인	미국 캘리포니아 92014 델 마르 10가 111에이 조영원, 특허법인코리아나

심사관 : 이치영

(54) 류마토이드관절염병원관련관절염성펩티드에대항하는면역보호유도에유용한백신조성물과방법

명세서

- <1> 관련 미국 특허 출원
- <2> 본 건은 현재 심리중인 미국 특허 출원 연쇄 번호 제 08/246,988호의 부분 연속이다.
- <3> 연방 지원 연구 공표
- <4> 본 발명은 국립 보건 연구원 기금 제 AR25443 호에 의한 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정한 권리를 가질 수 있다.

배경기술

- <5> 1. 발명의 분야
- <6> 본 발명은 자기 면역 질환, 특히 류마토이드 관절염의 조절과 방지에 관한 것이다. 보다 정확하
게, 본 발명은 특정 HLA 단백질에 포함된 배열과 유사한 아미노산 배열 (Q(K/R)RAA)을 가지는 관절염성
펩티드에 대한 호스트 (host)의 반응을 감소 또는 방지 할 수 있는 방법과 시약에 관한 것이다.
- <7> 2. 선행 기술의 역사
- <8> 인간에 있어, 류마토이드 관절염과 같은 자기 면역 질환은 특정 HLA 특이성과 관련되어 있다. 류
마토이드 관절염 (rheumatoid arthritis; RA)은 특히 클래스 II HLA 하플로타입 (haplotype) DW4, DW14,
DW15(모두 DR4 특이성 가짐) 및/또는 DR1과 유전자 단계에서 관련된 것으로 현재 믿어지고 있다. 이러한
하플로타입 각각은 흔히 "감수성 배열"(susceptibility sequence)로 일컬어지는 아미노산 배열을 포함한
다 (이하, "RA 감수성 배열"; 배열 식별 번호 1 과 2를 참조). R4 감수성 배열은 하나의 아미노산에 변화
가 있는 것으로 알려져 있다; 즉, QRRAA와 QKRAA (이하, "Q(R/K)RAA"). RA 혈청 양성의 성인 환자 90%
이상은 분자 내제 삼 고변화역에 RA 감수성 배열을 갖는 HLA DR 항원을 보유하고 있음이 또한 밝혀졌다.
R4 감수성 배열은 심각한 혈청 양성 유년 RA(juvenile RA; JRA)를 앓는 환자를 제외하고는, JRA의 개시에는
연루되지 않는다.
- <9> 감수성 배열의 QRRAA 변형체는 HLA 하플로타입 DW14, DW15 및 DR1 에서 확인되었다. QKRAA 변형

체는 HLA 하플로타입 DW4 에서 확인되었다. 변형체들의 고 보존 호몰로그 (highly conserved homologs) 는 클렙시엘라 (Klebsiella), 프로테우스 (Proteus), 살모넬라 (Salmonella), 락토코커스 (Lactococcus), 대장균 (Escherichia coli)의 dnaJ 히트 쇼크 단백질 (heat shock protein) 뿐만 아니라, 또한 엡스타인-바르 바이러스 (Epstein-Barr virus) 당단백질 gp110에서 밝혀졌다.

<10> 1992년에, 알바니 등은 (Albani, et al.), 치료 연구 저널 (J. Clin. Invest, 89: 327-331 (1992))에 재조합 dnaJ (rdnaJ)를 발현 분리한 보고를 발표하였다. 정제된 rdnaJ 는 DW4 단백질의 RA 감수성 배열에 대항한 토끼 항혈청에 특이적으로 결합한다. rdnaJ 에 대항하여 얻은 항혈청은 또한 DW4 동형 접합성 (homozygous) B 임파구뿐만 아니라 완전한 DW4 단백질에도 시험관 내에서 (in vitro) 결합한다. 생체 내 (in vivo) rdnaJ 부분의 류마티스 관절염에 대한 역할 또는 기작은 아직 제안된 바 없다.

<11> RA를 치료하기 위해 RA 감수성 배열을 이용하는 방법으로는 알려진 인간 HLA펩티드로부터 유도한 특정 RA 감수성 배열 펩티드로 인간을 RA에 대항하여 백신화하는 것이 제안되었다 (출판된 PCT 출원 참조, WO 제 9014835 호 (1990년 5월 31일출원), 칼슨 등의 발명자들).

<12> 박테리아 항원에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 다른 치료 방법이 스톨 등 (Stollé, et al.) 에 대한 미국 특허 제 4,732,757 호에서 밝혀졌다. 스톨 등은 일반적으로 인간 위장관 내에 존재하는 완전한 박테리아 여러 종류에 대항하여 우유에서 얻어낸 IgG 항체를 투여할 것을 제안하였다. 스톨 등에 의하여 시험된 IgG는 특정한 박테리아 항원을 목표하지 않고 전체 생물체 혼합물에 대항하여 얻어졌다. 이 특허는 dnaJ를 포함한 특정 박테리아 히트 쇼크 단백질의 RA 감수성 배열의 확인 전에 밝혀졌다. 따라서 스톨 등에 의해 기술된 항혈청은 RA 감수성 배열 펩티드에 대응하는 것이 아니다.

<13> RA 환자의 전신 면역 체계에 펩티드가 보고되기 전에는 RA를 치료하기 위한 어떤 시도도 관절염성 펩티드를 특정으로 목표하지 않았다. 따라서, RA 환자의 관절염성 펩티드에 대한 전신 반응을 개선하는 것뿐만 아니라 환자의 GI 관으로부터 전신순환으로 관절염성 펩티드가 유출되어 환자가 그 펩티드에 병원성 노출되는 것을 또한 방지하는 치료가 필요하다. 이상적으로는, 이러한 치료는 환자가 RA를 발병하기 전 또는 질환 초기 단계에 행하여진다; 따라서, 유전적 또는 면역적으로 RA 발병이 예정된 개인을 확인하는 방법 역시 필요하다.

<14> 본 발명은 이러한 각각의 필요에 관해 언급하고 있다.

<15> [발명의 요약]

<16> 본 발명은 관절염성 펩티드, 특히 dnaJ 에 대한 호스트 감작(sensitization)을 감소 또는 피하는 방법을 포함한다. 이 공개의 목적으로, "관절염성 펩티드"라는 문구는, 내용상 달리 요구되지 않는 한, 단백질과 그의 펩티드 절편으로 RA 감수성 배열을 포함하는 것으로 언급될 것이다.

<17> 놀랍게도, 특히 한 dnaJ 펩티드 (이하, "dnaJp1"; 배열 식별 번호 4)는 혈청 양성의 성인 RA 환자에서 상대적으로 강한 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 한 부분에서, dnaJp1의 상대적으로 강한 항원성이 dnaJp1 펩티드 백신에 유리한 점으로 사용된다. 이러한 백신은 미생물, 합성 또는 재조합 근원의 dnaJp1을 사용하고, 바람직하게는 dnaJ 펩티드 또는 인간 dnaJ 펩티드 호몰로그와 항원성 dnaJp1의 혼합물로 구성된다. 이와 다르게는, 본 발명의 백신은 dnaJp1을 코딩하는 플라스미드 또는 바이러스성 재조합 발현 벡터로 구성된다.

<18> 특히 바람직한 본 발명의 백신은 dnaJ 펩티드에 대한 구강 내성을 유도한다.

<19> 본 발명의 다른 부분으로, 항체 (바람직하게는 IgA)를 dnaJp1에 대항하여 기르고 (바람직하게는 젖에서) RA 환자에게 투여 (바람직하게는 장내 경로로 또한 바람직하게는 Ig의 Fab 절편으로) 한다.

<20> 본 발명은 또한 상기한 치료법에 대한 후보들을 선별하는 방법으로 (1) 관절염성 펩티드에 대한 세포 및 체액성 면역을 측정, 그리고 (2)개인의 HLA DR 항원에서 RA 감수성 배열을 측정하는 것을 포함한다.

<21> 본 발명의 바람직한 구현예의 세부 사항을 이하에 수반된 도면과 설명에 제시하였다. 일단 발명의 세부 사항이 밝혀지면, 당업자에게는 수많은 추가의 개선과 변화가 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

<22> 도 1은 초기의 치료하지 않은 RA ("초기 단계" RA) 환자 22명의 세포를 완전한 박테리아 dnaJ 단백질에 노출시켜 배양한 림프구의 성장을 정량화하고 있다.

<23> 도 1 그래프에서 막대로 표시한 반응은 림프구 자극 지수로 표현한다. 즉, (dnaJ와 배양시 측정 CPM)/(dnaJ 없이 배양시 측정 CPM). "CPM"은 분당 카운트(count-per-minute)를 의미한다. 시험한 대조 배양은 RA 없는 인간으로부터 얻은 림프구로 구성되어 있다.

<24> 도 2는 성인 RA와 유년 RA (JRA) 환자의 세포를 합성 dnaJp1 (아미노산 배열 QKRAAYDQYGHAAFE, 배열 식별 번호 4) 또는 아미노산 배열 DERAAYDQYGHAAFE("dnaJpV"; 배열 식별 번호 5)을 가지는 돌연 변이체 dnaJ 펩티드에 노출하여 배양한 림프구의 증식을 정량화하고 있다. 시험한 대조 (control) 배양은 RA 없는 성인 ("정상")으로부터 얻은 림프구로 구성되어 있다. 도 2 그래프에서 막대로 표시한 반응은 림프구 자극 지수로 표현한다. 즉, (dnaJ와 배양시 측정 CPM)/(dnaJ없이 배양시 측정 CPM).

<25> 도 3은 완전한 dnaJ에 의한 초기 단계 RA 환자 51 명의 각각의 혈청 샘플에서 생성된 항-dnaJ 항체의 활성 억제에 관한 억제 연구 결과를 나타낸다. 도 3 그래프에서 막대로 표시한 억제 백분율은 다음 식으로 표현한다:

<26> 억제 % = 100 (1-rdnaJ 포함시의 OD₄₆₀)

<27> (rdnaJ 비포함시의 OD₄₆₀)

- <28> 대조 혈청은 RA 없는 인간으로부터 얻었다.
- <29> 도 4는 효소결합항체법 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정한 rdnaJ에 대한 토끼 혈청의 시험관내 항체 반응을 나타낸다. 결과는 두 개의 플레이트 우물의 405nm 에서의 평균 OD로 나타내었다.
- <30> 도 5는 정제된 HLA MHC 클래스 II 항원결정기 (epitope)에 대한 여러 dnaJ펩티드의 결합 효율성을 비교하는 표이다. 결합은 비오틴화된 dnaJ 펩티드와 고정화된 HLA 분자간의 ELISA로 측정하였다. 결과는 405nm에서의 흡광 단위로서 표에 나타내었다. 시험한 펩티드는 dnaJp1 (배열 식별 번호 4), dnaJpV (배열 식별 번호 5), dnaJp2 (배열 식별 번호 6), S1 (배열 식별 번호 7) 및 S6(배열 식별 번호 8)이다. S1과 S2는 합성 펩티드로 그 아미노산 배열이 알려진 HLA DR 항원 배열과 일치한다.

발명의 상세한 설명

- <31> I. 본 발명 백신의 활성화
- <32> 초기 단계 RA 인간 환자는 RA 감수성 배열을 갖는 미생물 펩티드에 대해 비정상적으로 높은 세포 면역 반응을 갖는 것이 밝혀졌다. 이러한 관측은 단구(monocytes)에 의해 관절로 전달된 박테리아 항원의 무균 절편에 대한 면역 반응으로 RA가 유발 또는 악화된다는 결론으로 이르게 한다. 나아가, 이러한 면역 반응에 관련된 분자는 HLA DW4 및 DR1의 RA 감수성 배열에 교차-반응할 것이다.
- <33> 본 발명이 RA 병원성에 관한 어느 특정 이론에 국한 또는 의존하지는 않으나, 이하의 논의는 발명의 방법이 왜 그리고 어떻게 RA 관련 면역 기작을 이용할 수 있는가의 설명으로 제공되었다.
- <34> 류마티드 팬너스(pannus)의 육아 조직은 단구 작게 세포로 충전되어 있다. 인간에서 (하급의 동물과는 반대로) 이러한 조직 대식세포는 효과적으로 분열하지 못하고, 순환 혈액 단구로부터 지속적으로 공급되어야만 한다. dnaJ 또는 dnaJ 펩티드 절편 (dnaJp1과 같은)과 IgG 항체를 포함하는 면역 복합체는 따라서 먼저 장내 점막 지역에서 형성되어, Fc 수용체를 가지는 순환 혈액 단구에 의해 수용되는 것으로 추정할 수 있다.
- <35> 이러한 항원-포함 단구 몇몇은 관절을 향하여 전신으로 이동한다. RA 감수성 배열을 갖는 개인의 T 림프구는 아마도 특정 관절염성 펩티드에 초과-반응하도록 되어 있어, 극소량 항원에 관절 염증을 유발하기에 충분하다. 이러한 극소량의 일반 박테리아 항원은 전통적인 면역학적 수단으로는 거의 검출되지 않는다.
- <36> 일단 성립이 되면, 면역 복합된 IgG (류마티드 인자)와, 연골과 결합 조직의 퇴화 성분에 대한 항체의 진보한 개발에 의해 활막염도 제어할 수 있게 한다.
- <37> 그러나, 최소한 초기 단계의 류마티드 관절염만은 관절염성 펩티드를 갖는 IgG 면역 복합체 순환 단구의 지속적 투여에 의존해야 될 것이다.
- <38> 특히 하나의 dnaJ 펩티드에 대한 면역 반응이 놀랍게도 강한 것이 입증되었다. 도 2에 나타난 것처럼, dnaJp1 펩티드 (배열 식별 번호 4)는 성인 RA 환자혈액의 림프구 증식을, 동일한 세포의 dnaJp1 배열과 단지 두 개의 아미노산만이 다른 dnaJpV 펩티드 (배열 식별 번호 5)에 대한 반응에 비해 거의 열 배 정도로 촉진한다. dnaJp1 펩티드는 HLA MHC 클래스 II 분자 항원결정기에, RA 감수성 배열을 또한 포함한 인간 HLA DW4 펩티드(예로써, S1 및 S6; 배열 식별 번호 7-8) 보다 강하게-백배 또는 그 이상의 정도로-결합한다. 이러한 결합 친화도의 차이는 초기 류마티드 관절염 환자의 강한 T 세포 반응을 설명할 수 있다.
- <39> 본 발명의 백신으로 치료하기 위한 적합한 후보를 확인하는 방법을 이하에 기술하였다.
- <40> II. 본 발명의 백신 조성물
- <41> 본 발명은 관절염성 펩티드에 대한 생체내 반응에 대항하는 방어를 제공하기 위한 백신으로 항원으로서의 dnaJp1을 사용한다. 특히, 본 발명에 따르면, RA가 발발 또는 그 위험에 처한 것으로 진단된 성인과, 혈청 양성의 RA가 발발 또는 그 위험에 처한 것으로 진단된 유년은 dnaJp1 백신 조성물의 치료상 유효한 용량으로 치료한다. 본 발명의 dnaJp1 백신은 (1)정제된 dnaJp1 펩티드, 합성 dnaJp1 펩티드 또는 재조합 dnaJp1 펩티드를 포함한 백신 조성물; (2)dnaJp1 펩티드와 하나 또는 그 이상의 인간 dnaJ 호몰로 그를 포함하는 백신 조성물; (3)dnaJp1 펩티드와 다른 dnaJ 단백질 절편 하나 또는 그 이상을 포함하는 백신 조성물; 또는(4)dnaJp1 펩티드를 코딩하는 바이러스성 재조합 발현 벡터 또는 플라스미드의 백신 조성물을 포함한다.
- <42> A. 펩티드 백신 조성물
- <43> 펩티드를 정제, 합성 또는 재조합 형태로 제조하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 본 발명에서의 사용을 위한 충분한 순도로 항원성 펩티드를 제조함에 적당하다. 이러한 면에서, "실질적인 순수한"이라는 용어는 생체 내에서 보통 섞일 수도 있는 다른 화합물이 실질적으로 섞이지 않은 단백질을 말한다. 발명의 내용에서, 이 용어는 RA 감수성 배열 (특히 dnaJp1, dnaJ 펩티드와 인간 dnaJ 펩티드 호몰로그)을 가지는 균일한 단백질 또는 펩티드를 말하며, 균일성은 당업자에게 알려진 순도 기준에 참고하여 결정한다 (단백질의 N-말단 아미노산 배열이 알려진 정도로 충분한 순도와 같은 것).
- <44> 실질적으로 순수한 관절염성 단백질과 펩티드는 완전한 미생물체 (특히 박테리아), 미생물 발현, 합성, 및/또는 친화성 크로마토그래피와 같은 당업자에게 알려진 정제 방법에 의해 수득할 수 있다. 이러한 기술은 dnaJp1을 포함한 항원성 dnaJ 펩티드 절편을 수득하기 위해서도 사용될 수 있다.
- <45> dnaJp1과 다른 여러 dnaJ 단백질 절편 (펩티드)의 아미노산 배열은 배열 식별 번호 4-6으로 부착된 배열 목록에 기재되어 있다. 나아가, 대장균 dnaJ 단백질의 전체-길이 아미노산 배열이 배열 식별 번호 1에 기재되었다. dnaJp1 펩티드의 항원 활성이 기술된 다른 dnaJ의 활성보다 실제로 높기는 하여

도, 기술된 완전한 단백질과 각각의 펩티드는 항원성이다.

- <46> 다른 여러 박테리아 dnaJ 단백질과 인간 dnaJ 호몰로그의 뉴클레오티드 및 아미노산 배열이 알려져 있다. 일례로 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*) dnaJ는 반 아셀돈크 등에 의해 보고되었다 (Van Asseldonk 등, *J. Bact.*, 175:1637-1644 (1993)). 나아가 dnaJ 인간 호몰로그 아미노산 및/또는 뉴클레오티드 코딩 배열 (RA 감수성 배열이 결핍된)도 첼라이아 등에 의해 보고되었다 (Chelliah 등, *Biochim. Biophys. Acta*, 117:111-113, 1993, Oh 등, *Biochim. Biophys. Acta*, 117: 114-116, 1993; Raabe 와 Manley, *Nuc. Acids Res.*, 19:6645, 1992; 그리고, Sugito 등, *FEBS Lett.*, 358:161-164, 1995). 이러한 문헌들의 내용은 본 발명에 따른 dnaJp1 펩티드 또는 dnaJp1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 혼합물의 백신 조성물을 확인하고 제조회에 있어 여기에 참고로서 본 공개에 포함한다.
- <47> 그러한 배열을 참고로, 본 발명의 백신 조성물에 유용한 단백질 또는 펩티드는 알파-아미노기의 t-BOC 또는 FMOC 보호와 같은 통상 사용하는 방법으로 합성할 수 있다. 양 방법은 모두 단계적 합성으로 펩티드의 C-단말부터 하나의 아미노산을 각 단계에서 부가한다 (Coligan 등, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9 참조). 본 발명의 펩티드는 또한 메리필드 (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149, 1962), 그리고 스튜어트와 영 (Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco, 1969, pp 27-62)에 의해 기술된 것과 같이 0.1-1.0 mMol 아민/g 중합체를 포함한 공중합 (스티렌-디비닐벤젠)을 사용하는 다양한 공지의 고체상 펩티드 합성법에 의해 합성할 수 있다. 화학 합성 완료시, 펩티드는 액체 HF-10% 아니솔로 0°C에서 약 1/4-1 시간동안 처리하여 탈보호화하여 중합체로부터 잘라낸다.
- <48> 시약을 증발시킨 후, 1% 아세트산 용액으로 펩티드를 중합체로부터 추출하여 이후 동결 건조하여 조물질을 얻는다. 이는 "세파맥스 등록상표 6-15"의 펠투와 또는 5% 아세트산을 용매로 하는 "세파로스 등록상표" 친화성 칼럼과 같은 기술로 보통 정제한다. 칼럼의 적합 회분을 동결 건조하여 균일한 펩티드 또는 펩티드 유도체를 얻고, 아미노산 분석, 얇은 막 크로마토그래피, 고속 액체 크로마토그래피, 자외선 흡수 분광법, 몰 회전, 용해도와 같은 표준 기술로 특정화하고 고체상 에드만 붕괴에 의해 배열 결정한다.
- <49> 환자의 기존 상태에 따라, 환자의 전신 면역 체계에 작용하게 될 면역자극제 및/또는 면역억제제를 투여하는 것 또한 바람직하다. 이러한 활성을 갖는 적합한 물질은 당업계에 공지되어 있고 시클로스포린 A와 항-CD4 항체 (면역 억제제를 위함) 뿐만 아닌 인터루킨-6 (억제제/세포상해 T 세포의 자극을 위함)을 포함한다.
- <50> 이러한 화합물은 개별적으로 또는 본 발명의 백신과의 혼합물로 투여 가능하다.
- <51> 본 발명의 dnaJp1 펩티드 백신은 생리학적으로 용인되는 담체와 백신의 활성 성분을 섞어 투여하는 것으로 제조할 수도 있다. 이러한 담체는 사용하는 용량과 농도가 수용자에게 비독성이어야 한다. 일반적으로, 이러한 조성물의 제조는 식염수, 완충용액, 아스코르브 산과 같은 항산화제, 저 분자량 폴리펩티드 (10 잔기 이하), 단백질, 아미노산, 글루코스 또는 덱스트린을 포함하는 탄수화물, 또는 EDTA와 같은 킬레이트화제, 글루타치온과 다른 안정화제와 부형제와 함께 특정 백신 항원을 조합하여 이루어진다. 이러한 조성물은 현탁액, 에멀전 또는 동결 건조 형태일 수 있고 약제학적으로 용인되어야 한다; 즉, 목적하는 적용의 사용에 적합하게 제조되고 승인되어야 한다.
- <52> TGF- β 를 포함하는 조성물에 관하여, TGF- β 류의 화합물은 통상으로 불활성 전구체 형태로 생산되어 산이나 단백질 분해효소에 노출시켜 활성화된다. 따라서 당업자는 생체내의 TGF- β 성분의 활성화를 방해하거나 성분을 너무 이르게 활성화 (즉, 조성물의 투여 전)하지 않는 본 발명의 RA 백신 조성물 사용을 위한 담체 및/또는 부형제를 선별할 수 있다.
- <53> B. 본 발명의 뉴클레오티드 백신
- <54> 전통적인 항원 백신으로서의 펩티드를 투여하는 대신 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 "유전자 백신"으로서의 dnaJp1을 투여함으로써 특정한 이점을 얻을 수 있다. 일례로, 단백질성 항원 백신과 관련된 잠재적 독성 위험 (예로써, 아나필락틱 쇼크; anaphylactic shock)을 항원 자체 대신 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 투여하고 생체 내에서 발현시킴으로써 실제적으로 피할 수 있다.
- <55> 여기서 사용된 "폴리뉴클레오티드"는 분리된 절편 또는 그보다 큰 구조의 성분 형태로서의, 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 의미한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 dnaJ/dnaJp1 펩티드는 재조합 유전자 발현 벡터에 삽입된 이중 또는 단일-사슬 DNA 또는 RNA일 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 비복제 또는 당업계 공지 방법으로 호스트 게놈 내에서 복제할 수 없는 것이어야만 한다.
- <56> 본 발명에 관련된 dnaJp1과 다른 항원성, 면역 자극성 또는 면역 억제성 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 배열은 박테리아와 인간 게놈의 축퇴를 고려하여 펩티드의 아미노산 배열을 추정함으로써 곧바로 검증할 수 있다 (만약 알려지지 않았다면). dnaJ 단백질 (dnaJp1을 포함)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 배열은 부착한 배열 목록에 배열 식별 번호 1로 나타내었다.
- <57> 핵산 회합에 의한 선별법은 어떠한 생체로부터 어떠한 폴리뉴클레오티드 배열도 분리 가능하게 하여 적합한 프로브 또는 항체 제공을 가능하게 한다. 올리고뉴클레오티드 프로브로서, 문제되는 단백질을 코딩하는 배열의 부분에 해당하는 것은 화학적으로 합성할 수도 있다. 이는 짧은, 올리고-펩티드 부분의 아미노산 배열이 알려져 있거나 추정되어야만 한다.
- <58> 일례로, 관심상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다고 추정되는 cDNA 라이브러리는 cDNA에서 유도한 다양한 mRNA를 난자에 주사하여 cDNA 유전자 생성물의 발현을 위한 충분한 시간을 주어 선별할 수 있으며, 목적하는 cDNA 발현 생성물의 존재는 예로써 관심상의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 펩티드에 특이한 항체를 이용하거나, 또는 관심상의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 펩티드의 특이한 반복 모티프 및 조직 발현 형태의 특성에 대한 프로브를 이용하여 시험할 수 있다. 이와 다르게는, 펩티드에 특이한 항체를 이용하여 하나 이상의 항원결정기를 가지는 관심상의 펩티드 발현에 의해 cDNA 라이브러리

를 간접적으로 선별할 수 있다.

- <59> 이러한 항체들은 다클론성 또는 단클론성으로 유도된 것으로 관심상의 cDNA 존재를 알리는 발현 생성물을 검출하는데 사용한다.
- <60> 본 발명에서 사용하는 폴리뉴클레오티드는 또한 당업계 공지 기술과 핵산 합성 장치로 합성될 수 있다. 이에 관한 참고로는 아우수벨 등의 분자 생물학의 현대 방법, 2장과 4장 (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Chs.2 and 4, Wiley Interscience, 1989) (게놈 DNA); 그리고 마니아티스 등의 분자 클로닝: 실험실 편람 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982) (cDNA) 등을 참조한다. 구성과 사용의 편의를 위해, 본 발명의 재조합 유전자 발현 벡터 이용에는 합성 폴리뉴클레오티드와 cDNA가 일반적으로 바람직하다.
- <61> 본 발명의 재조합 유전자 발현 벡터로 바람직하게는 본 발명의 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 또는 코스미드이지만, 또한 바이러스나 레트로바이러스일 수 있다. 바람직하게, 벡터는 "벗은 것"이어야 한다; 즉, 운반체 (예로써, 리포솜, 콜로이드성 입자 및 유사체)와 연루되지 않는다. 편의를 위해, 본 설명에서 사용한 "플라스미드"라는 용어는 관심상의 펩티드 발현을 위한 적절한 사용에 따라, 플라스미드 또는 코스미드를 의미한다 (양자간의 선택은 관심상의 펩티드를 코딩하는 유전자의 크기에 의해 결정된다). "작동적으로 코딩"은 폴리펩티드 발현에 필요한 모든 조절 배열과 (일례로, 프로모터) 연루된 유전자를 말한다.
- <62> 외래 구조 유전자 삽입부를 작동적으로 코딩하는 통상 사용하는 플라스미드 벡터는 pBR322 PLASMID이다. pBR322는 표지로 함께 있는 암피실린 저항 유전자를 포함한다; 그러나, 인간 사용을 위해 이러한 암피실린 저항은 피해야만 한다. 유전자 면역 방법에 유용하고 암피실린 저항을 갖지 않는 개량된 벡터는 1996년 1월 30일 출원된 통상 소유의 미국 특허 출원 연쇄 번호 제 08/593,554 호에 기재되었고, 이의 내용은 여기에 참고로 편입하였다.
- <63> 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 바이러스성 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 벡시니아, 또는 레트로바이러스와 같은 RNA 바이러스를 포함한다. 바람직하게는, 레트로바이러스성 벡터는 쥐 또는 조류 레트로바이러스의 유도체이다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스성 벡터는, 다음을 그 제한으로 하지 않는 예를 포함한다: 모로니 유린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하르비 유린 육종 바이러스 (HaMuSV), 유린 유방암 바이러스 (MuMTV), 및 루스 육종 바이러스 (RSV)가 있다. 이들 모든 벡터는 선별 표지를 위한 유전자를 전달 또는 함유할 수 있어 형질전환 세포를 확인하여 생성할 수 있게 한다.
- <64> 재조합 레트로바이러스는 불완전하므로, 감염성 벡터 입자를 생산하기 위해서는 도움을 필요로 한다. 예로써, 이러한 도움은 LTR 내의 조절 배열의 조정하에 있는 레트로바이러스 구조 유전자 모두를 코딩하는 플라스미드를 포함하는 헬퍼 세포계를 사용하여 제공할 수 있다. 이러한 플라스미드는 캡시드화를 위한 RNA 전사체를 인식하여 패키지와 기작을 가능하게 하는 뉴클레오티드 배열을 갖지 않는다. 패키지 신호가 결핍된 헬퍼 세포계는 Ψ 2, PA317과 PA12를 포함하고 이는 그 예를 제한하는 것은 아니다. 이러한 세포계는 게놈이 패키징화되지 않았으므로 빈 비리온을 생산한다. 만약 레트로바이러스성 벡터가 패키지 신호는 완전하지만, 구조 유전자가 관심상의 다른 유전자로 대체된 헬퍼 세포에 도입되면, 벡터는 패키징되어 벡터 비리온이 생산될 것이다.
- <65> 투여에 관해서, 본 발명의 핵산 백신은 식염수와 같은 담체로 조성되거나, 또는 덜 바람직하게, 리포솜이나 콜로이드 입자와 같은 운반체와 함께 투여할 수 있다. 이러한 운반체의 사용과 제조 방법은 당업자에게 공지 또는 쉽게 확인될 수 있는 것이다.
- <66> II. 본 발명의 치료법을 위한 적합한 후보 선정에 사용되는 시약과 방법
- <67> A. 본 발명의 치료법을 위한 적합한 후보의 특성.
- <68> 본 발명의 치료법을 위한 기본 후보는 초기 단계의 RA를 가지거나 발병이 예정된 개인이다. 이러한 점에서, 하나의 경고와 함께, 개인은 그의 HLA 분자가 RA 감수성 배열을 포함했을 때, RA 발병이 "예정된" 것으로 생각한다.
- <69> 그러나 이 경고는, 그럼에도 불구하고, 특정의 "정상" 개인 (즉, RA 가족 병력이 없고 스스로도 발병하지 않은)이 RA 감수성 배열을 포함한 내인성 HLA DR 항원을 보유할지도 모른다는 관측에 근거한다. 그러나 이러한 개인의 RA 감수성 배열 존재에도 불구하고, RA 감수성 배열 HLA 항원에 대한 자기 면역 반응을 일으키지 않을 수도 있다.
- <70> 앞서의 관측에 따라 RA 발병은 RA 감수성 배열을 비-자신으로 인식하는 T 세포 종류의 인지뿐만 아니라, RA 환자의 항-RA 감수성 배열 항체 생성에도 강하게 연관된 것으로 추정할 수 있다 (실시예 IV와도 3 참조, dnaJ에 의한 RA 환자 림프구의 항원 결합 억제제를 나타내며, 억제 정도가 정상 개인 림프구에서 관측한 것을 상당히 초과함). 따라서, HLA 항원이 RA 감수성 배열을 갖는 개인과 항-RA 감수성 배열 항체를 생산하는 개인은, 본 내용의 목적에 따라, RA에 "예정된" 것으로 간주한다. 초기 단계의 RA를 가지거나 발병이 예견되는 개인의 선별 방법을 ("RA 선별법") 이하 기술하였다.
- <71> B. RA 선별법의 단계
- <72> RA 선별법은 일반적으로 (1)개인의 HLA 분자에 RA 감수성 배열 존재 여부를 측정 (특히, DW4 분자), 그리고 (2)개인 림프구의 관절염성 단백질 또는 펩티드 (특히 danJp1)의 항원 형태에 노출 시 반응에 따른 항체 생성 여부를 측정 단계를 포함한다. 이와 다르게는, 선별법은 후자의 방법만을 가질 수도 있는데, 이는 개인의 림프구가 RA 감수성 배열 단백질에 노출 시에 반응하여 항체를 생성하면, 그 개인은 RA 발병이 매우 가능한 것으로 추정되기 때문이다.
- <73> RA 선별법의 HLA 유형화 단계를 수행하기 위해서는, 생물 샘플로 림프구를 포함항직한 어느 액이나 조직, 바람직하게는 전체 말초 혈액 또는 활막 액 ("림프구 샘플")을, RA 선별을 위한 개인에게서 전통적 방법으로 얻는다. 개인의 HLA 분자가 RA 감수성 배열을 갖는지의 여부는, 전통적인 HLA 유형화 기술

로 당업자에게 공지된 것을 사용할 수 있다. 이러한 점에서, 가장 잘 알려진 HLA 항원의 뉴클레오타이드와 아미노산 배열이 잘 확인되어 왔고 쉽게 식별될 수 있음은 다행하다 (예로써, Marsh 등., Tissue Antigens, 37:181-189 (1991), 및 Bodmer 등, Tissue Antigens 37:97-105 (1991) 참조).

- <74> 일례로, 마르시와 보드메르 등에 의해 보고된 폴리뉴클레오타이드 배열과, 및/또는 이곳에 추가된 배열 목록의 폴리뉴클레오타이드 배열을 참고로, 당업자는 림프구 샘플의 특이 HLA 항원 측정을 위한 폴리뉴클레오타이드 배열을 목표하여 회합하는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 만들 수 있을 것이다. 적당한 프로브를 만드는 기술과 회합 기술의 수행도를 이하 좀더 자세히 기술하고 이는 불필요한 실험 없이 당업자에게 사용될 수 있다.
- <75> 그러나, 통상적으로 HLA 유형화는 혈청에서 수행하는데 즉, 보체와 함께 림프구 샘플에 대한 표준 항혈청 (특이성이 알려진)을 사용하고 시험 세포가 사멸하는지의 여부를 관찰한다. HLA 유형화는 시험 림프구를 알려진 HLA 특이성을 가지는 B 림프구와 혼합하는 "혼합된 림프구 반응"과 같은 다른 전통적 면역 기술로 수행할 수 있다. 혼합된 림프구 반응에서, 알려진 HLA 유형의 B 세포와 특이성을 가지는 시험 세포는 자극되어 증식한다. 이러한 모든 HLA 유형화 기술의 수행은 당업계 기술의 범주에 충분히 포함된다.
- <76> RA 선별법의 면역 단계를 수행하면서, 관절염성 펩티드를 액상 또는 고체상 면역측정 형태 (당체에 결합시)의 항-관절염성 펩티드 항체를 사용하여 림프구 샘플에서 측정할 수 있다. 이러한 형태에 사용하는 항체는 이하 기술된 바에 따라 제조할 수 있다.
- <77> 고체-상 측정 행태의 공지 당체로 사용되는 예는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라제, 자연 또는 개량된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 한천 및 자철광을 포함한다. 당체의 성질은 본 발명의 목적에 따라 가용성 또는 불용성일 수 있다.
- <78> 본 발명의 항-관절염성 항체를 사용할 수 있는 면역측정 유형의 예로는 직접 또는 간접 형태의 경쟁 및 비-경쟁적 면역측정이 있다. 이러한 면역측정의 예로는 ELISA, 방사성면역측정 (RIA), 및 샌드위치(면역메트릭) 측정이 있다. 본 발명의 항체를 사용한 관절염성 펩티드의 결합은 전진, 후퇴, 또는 동시법으로 전개하는 생리학적 샘플의 면역조직화학적 측정을 포함한 면역측정을 사용하여 실행한다. 당업자는 불필요한 실험 없이도 다른 면역측정 형태를 알고 또는 쉽게 구분 할 수 있다.
- <79> 실시예 V 에 기술한 방법안은 면역측정 (여기서 효소-결합항체법, 또는 ELISA)에 의해 RA 선별법이 어떻게 수행될 수 있는가를 예시한다. RA 선별법의 바람직한 구현예로, 통상 방법에 의해 수득한 초기 단계 RA 보유가 의심 또는 질환이 예정된 환자의 림프구를 배양하고 바람직하게 dnaJp1 (배열 식별 번호 4, 이상 기술한대로 제조된)인 항원성 RA 감수성 펩티드에 노출시킨다. 이후 배양한 림프구의 항원성 dnaJ 펩티드에 대한 세포 면역 반응을 측정한다. 이와 다르게는, 실시예 IV 에 기술한 억제 연구에 따라 방법만을 실시한다; 즉, dnaJp1 펩티드와 선배양을 통한 항원 결합을 측정한다.
- <80> 본 발명의 항-관절염성 펩티드 항체는 또한 측정 가능하게 표식화될 수 있다. 당업자에게는 여러 상이한 표식과 표식 방법이 알려져 있다. 본 발명에서 사용 가능한 표식 형태의 예로는 효소, 방사성 동위원소, 형광 화합물, 콜로이드 금속, 화학발광 화합물 및 생-발광 화합물을 포함한다. 당업자는 본 발명의 항-관절염성 펩티드 항체에 결합하는 다른 적합한 표식을 알거나 일상의 실험으로 그러한 것을 확인할 수 있다. 더 나아가서, 본 발명의 항-관절염성 펩티드 항체에 대한 이러한 표식의 결합은 당업자에게 통상적인 표준 기술을 이용하여 할 수 있다. 다른 표식화 기술로 보다 큰 감도를 도모하는 것으로는 항체를 저 분자량 합텐에 결합하는 것이다. 이러한 합텐은 이차 반응 방법으로 특이하게 검출될 수 있다. 예로써 이러한 목적의 합텐으로 아비딘과 반응하는 비오틴을 통상 사용한다.
- <81> RA 감수성 배열 펩티드가 포함된 HLA DR 항원 분자를 가지는 개인이지만 RA가 예정되지 않은 개인과 유전적으로 RA에 예견된 개인을 구별하기 위해, 항원성 dnaJ 또는 RA 감수성 배열 펩티드에 대한 개인의 면역 반응을 또한 시험할 수 있다. 이를 위해, 림프구 샘플을 항원성 관절염성 펩티드와 배양한다. 이후에 샘플에서 생성된 어느 항-관절염성 펩티드 항체는 이상 또는 실시예 V 에서 기술한 적합한 면역측정 형태에 의해 측정한다. 측정의 편의를 위해, 항원성 관절염성 단백질 또는 펩티드는 이상 기술한 대로 측정 가능하게 표식화될 수 있다.
- <82> C. 선별법에 사용하는 시약과 키트
- <83> 본 발명의 RA 선별법에 사용하는 시약은 관절염성 펩티드 (바람직하게는 이상에서 기술한 재조합 방법 또는 합성으로 제조한 것들), 면역측정을 위한 항체, HLA 선별 회합 측정에 사용하는 폴리뉴클레오타이드를 코딩하고 HLA 분자에 보충하며 특이하게 결합하는 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 프라이머를 포함한다. 이러한 시약 하나 이상을 포함하는 RA 선별법 실행 사용을 위한 편리하고, 저장 가능한 포장의 키트는 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- <84> 본 발명 선별법의 사용을 위한 펩티드와 올리고뉴클레오타이드를 수득하는 방법은 이상의 다른 곳에 기재되었다. 본 발명의 이 방법 사용을 위한 항체는 합성 또는 재조합 펩티드뿐만 아니라, 완전한 관절염성 단백질에 대항하여 만들 수 있다. 이러한 펩티드는 RA 감수성 배열을 포함하고 바람직하게는 dnaJp1 (배열 식별 번호 4)로 구성되어진다.
- <85> 예로써, 본 발명의 방법 사용을 위한 적합한 항원성, 관절염성 펩티드는 여기에서 부착한 식별 목록의 배열 식별 번호 4 와 5로 기술되었다. 배열 식별번호 4 와 5의 RA 감수성 배열에 따르는 아미노산은 RA 감수성 배열에 의한 T-세포 활성화에 필요하지 않으나, 펩티드를 고긴장시켜, 항원성이 되게 한다. 이러한 목적으로, 본 발명의 항체 제조를 위해 사용하는 바람직한 항원성, 관절염성 펩티드는 총 길이가 최소 약 7-15인 아미노산이어야 한다.
- <86> 바람직하게는, 항체를 재조합 관절염성 펩티드에 대항하여 길러서 항혈청이 RA 감수성 배열에 특이함을 확신하도록하고 상대적으로 대규모로 항원성 펩티드를 생산 가능하게 한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 항체는 우유와 같은 젖에서 길러 IgG의 생산을 선택적으로 자극하도록 한다 (따라서 다른 GI 박테

리아 항원에 비해 관절염성 펩티드에 대한 항혈청의 특이성이 증가).

<87> 본 발명의 항체는 개인 GI 관의 대장균 군집과 이하 기술한 특정 치료용 양식 내의 HLA 분자상의 RA 감수성 배열 존재를 측정하는데 유용하다.

<88> 정상 동물에서 dnaJ 또는 다른 관절염성 단백질 또는 펩티드에 대한 면역 반응을 유도하기 위해서는, 당업계 공지 기술을 이용한 접합으로 당체 단백질을 연결 시키므로써 단백질 또는 펩티드의 항원성을 제고시킬 수 있다. 이들의 항원성을 제고하기 위해 분자에 화학적으로 연결되는 통상 사용 물질은 건공 소라 헤모시아닌(KLH), 티로글로불린, 소 혈청 알부민 (BSA), 및 파상풍 변성 독소를 포함한다. 연결된 분자는 이후에 동물 (예로, 마우스, 토끼 또는 소) 면역에 사용한다.

<89> 다중 주사 면역 방법안은 항원성 단백질로 동물을 면역화 하는 사용에 바람직하다 (예로써, Langone 등, 편저, "Production of Antisera with Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injection" Methods of Enzymology, Acad. Press, 1981 참조). 일례로, 토끼의 항체 반응은 완전한 프로인트 보조액(Complete Freund's Adjuvant)에 에멀전화된 1 mg의 항원성 단백질을 피내 주사하고 및 주 후 불완전한 프로인트 보조액 내의 동일 항원을 한 번 이상 부스트하여 얻을 수 있다. 본 발명의 소에서의 치료용 항체 생산을 위한 특히 바람직한 방법을 이하에서 더 설명한다.

<90> 면역된 동물이 생산한 다클론성 항체는 예로써 항체가 길러진 단백질 또는 펩티드가 결합된 기질에 결합 및 유출에 의하여 더 정제할 수 있다. 당업자는 단클론성 항체뿐만 아니라 다클론성 항체의 정제 및/또는 농축을 위한 면역 방법의 통상의 다양한 기술을 알 것이다 (예로써, Coligan 등, Current Protocols in Immunology, Unit 9, (Wiley Interscience, 1991) 참조).

<91> 단클론성 항체 제조로, 마우스 또는 래트(rat) 면역이 바람직하다. 본 발명에서 사용하는 "항체" 용어는 완전한 분자 뿐 아니라 그의 절편, 예로써, Fab 및 F(ab')₂로 관절염성 단백질 또는 펩티드에 결합할 수 있는 것을 포함한다. 또한, 본문에서, "본 발명의 mAb"는 관절염성 단백질 또는 펩티드에 특이성을 갖는 단클론성 항체를 말한다.

<92> 단클론성 항체 (mAb)를 분비하는 하이브리도마의 일반 제조법은 잘 알려져있다 (Kohler와 Milstein, Nature, 256:495, 1975). 요약하면, 코흘러와 밀스타인이 기술한 대로, 이 기술은 흑색종, 기형암 또는 경부암, 신경육종, 폐암을 가지는 다섯명 각각의 환자의 지역상 배액하는 림프 결절에서 림프구를 분리하는 것을 포함한다. 림프구는 외과적 견본으로부터 수득, 집합하여, 이후 SHFP-1과 결합한다. 암 세포계에 결합하는 항체의 제조를 위해 하이브리도마를 선별한다. 관절염성 단백질에 특이성을 갖는 mAb의 제조 및 확인에는 동등한 방법이 사용될 수 있다.

<93> 본 발명의 mAb 중 관절염성 단백질에 특이성을 갖는 것을 확인하는 것은 관심상 mAb의 기본 반응 양식을 측정하는 상대적으로 일반적인 선별법 (효소-결합항체법, 또는 "ELISA"와 같은 것)을 이용할 수 있다.

<94> 시험하는 mAb가, 본 발명 mAb의 RA 관절염성 단백질에 결합하는 것을 방해하는 여부를 측정함으로써 불필요한 실험 없이도 본 발명의 mAb와 같은 특이성을 갖는 여부를 결정하는 하나의 mAb의 평가가 가능하다. 본 발명의 mAb 결합 감소와 같이, 시험한 mAb가 본 발명의 mAb와 경쟁하면, 이는 두 단클론 항체가 동일 또는 밀접하게 관련된 항원결정기에 결합하는 것이다.

<95> 하나의 mAb가 본 발명의 mAb와 같은 특이성을 갖는 여부를 측정하는 또 다른 방법은 본 발명의 mAb를 정상 반응성의 항원과 선-배양하고, 시험한 mAb의 항원에 대한 결합 능력이 억제됨의 여부를 측정한다.

<96> III. 본 발명의 치료적 방법

<97> A. 본 발명의 백신 사용 방법

<98> 본 발명의 펩티드 백신은 환자의 GI 관에서 선택적으로 IgA 생성을 자극하고, 구강 내성을 유도함에 충분한 방식으로 바람직하게 투여한다 (일반적인 동물과 인간에서 항원 공급에 따른 구강 내성 유도에 관하여는, Husby 등의 J. Immunol. 152:4663-4670 (1994) 참조, 항원에 대한 구강 내성에 관한 당업계의 지식 상태를 예시하기 위하여, 그 내용을 여기에 참고로서 포함한다). 따라서, 바람직하게는 본 발명의 항원성 펩티드는 당업계에서 IgM을 IgA로 바뀔을 유도하는 면역 자극제와 함께 투여한다; 예로써, TGF-β는 또한 전신 헬퍼 T 세포 활성을 억제할 수 있다. 가장 바람직하게, 본 발명의 항원성 펩티드/IgA 면역자극제는 GI 관내로 백신 효과를 지역화하기 위해 내부 투여할 수 있다. 이와 다르게는, 본 발명의 펩티드 백신은 면역치료 업계에서 용인하는 어느 방법으로도 투여할 수 있다. 예로써, 혈관내부로.

<99> 본 발명의 뉴클레오타이드 백신 투여에 바람직한 방법은 피내 경로를 이용하는 것이다. 관심상의 항원성 펩티드를 코딩하는 재조합 유전자 발현 벡터를 이용한 피내 유전자 면역화 방법은 1996년 1월 30일 출원된 통상 소유의 미국 특허 출원 연쇄 번호 제 08/593,554 호와 1995년 6월 7일 출원된 연쇄 번호 제 08/446,691호에 기재되었고, 이의 내용은 여기에 참고로 편입하였다. 이 내용에 따르면, 요약하여, 재조합 유전자 발현 벡터를 주사, 흡수 또는 호스트의 피부 또는 점막을 통한 피부 통과성 전달과 같은 방법으로 투여한다. 이와 다르게는, 본 발명의 뉴클레오타이드 백신은 면역 업계에서 용인하는 어느 방법으로도 투여할 수 있다: 예로써, 근육내 주사.

<100> 본 발명의 펩티드와 뉴클레오타이드 백신 투여 방법안은 그 조성물 및 환자의 연령, 체중 및 상태에 따라 변화한다. 그러나, 바람직한 RA 펩티드 백신 투여 방법안은 면역상 유효한 백신 용량의 매일 구강 (장내) 투여로, 이상 기술한 방법과 통상의 항-염증 치료 (예로써, 스테로이드 또는 비스테로이드 항-염증 치료제 및/또는 마취제)와 같은 기타 형태의 치료와 함께 또는 함께 아닌 것으로 실시한다.

<101> 용량의 빈도에 따라, 본 발명의 각 펩티드 백신의 면역상 유효 용량은 항원성 단백질 또는 펩티드 100 μg - 100mg (바람직하게는 1-100 mg)의 범위이다. 항원성 펩티드의 매일 용량은 가장 바람직하게 약 1 mg/하루의 분량으로 주어진다.

- <102> 본 발명의 방법에 따라 공급하는 각 재조합 유전자 발현 벡터의 용량은 호스트에서의 목적하는 반응과 사용 벡터에 의해 실현 가능한 유전자 발현의 수준에 의해 변화한다. 벋은 재조합 유전자 발현 벡터를 내피 경로로 도입하는 경우, 약 0.3 μg 의 미량 폴리뉴클레오티드를 피부 또는 점막을 통해 투여하여 장기 지속 면역 반응을 유도할 수도 있으나, 일반적으로, 100-200 μg 의 폴리뉴클레오티드를 단일 용량에 투여한다.
- <103> 그러나 본 발명의 목적을 위해서는, 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩하는 항원성 폴리펩티드 발현을 일으키는데 충분한 용량의 벋은 유전자 발현 벡터를 공급하는 것이 적합하다. 이러한 용량은 상이한 면역자극성 발현 수준을 실현하기 위해 변형될 수 있다. 발현된 펩티드의 존재와 양을 확인하는 방법은 당업자에게 공지이므로 자세히 설명하지 않는다. 이의 특정 방법은 이하 기술한 실시예에 예시되었다; 일반적으로, 이는 면역측정 (효소-결합항체법과 같은), PCR 기술, 및 당업계 공지의 기술에 따라 수행하는 면역조직 분석을 포함한다. 투여하는 폴리뉴클레오티드 용량은 임상업계 당 개업의에게 알려진 생체내 임상 징후뿐만 아니라 이러한 측정 및 정성적 방법에 의해 제공되는 정보를 기초로 목적하는 발현 수준을 실현하기 위해 수정될 수 있다.
- <104> 바람직하게는, 본 발명의 벋은 유전자 발현 벡터는 "낮은" 용량으로 투여한다 (예로써, 마우스에서, 약 50 μg 또는 그 이하의 면역자극 폴리뉴클레오티드).
- <105> 당업자는 인간에서의 사용을 위한 동등한 용량 수준을 쉽게 결정할 수 있다. 당업자는 백신화와 면역치료 방법만에 사용되는, 본 발명의 방법 사용에 적합한 과정으로서의 투여 과정에 익숙하다 (즉, 프 라이밍, 부스터 및 유지 투여).
- <106> RA 백신의 어느 면역자극/면역-억제 성분도 통상 용량으로 사용한다 (예로써, 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 인터 루킨-6). 이러한 용량은 당업자에 의해 공지 또는 쉽게 확인 될 수 있다. 초기 단계의 RA 환자 치료는 섹션 III. B 이하 하부에 기술된 RA 대리 종말점 관찰까지 또는 그 이상으로도 지속될 수 있다.
- <107> RA가 예정되었으나, 아직 발병하지 않은 환자의 백신화는 환자의 GI 관 액체 및/또는 말초 혈액 순환 내 항-관절염성 펩티드 IgA의 측정 가능한 증가가 생기기 전에 충분히 본 발명의 RA 백신 하나 또는 이상의 용량으로 단-기간으로 투여함으로 수행한다. 그러나, 일반적으로는, 본 발명 RA 백신의 바람직한 사용은 초기 단계 RA 환자들에 대한 것이다.
- <108> B. 본 발명 방법의 치료 효능 징후
- <109> 일반적으로, 시간에 따른 본 발명 치료 방법의 효능은 질환 예정된 (그러나 발병하지 않은) 환자의 임상적 RA 징후 결핍으로 판단한다. RA 보유로 진단된 환자는, 본 발명 방법의 효능을 환자 증상 강도의 경감 또는 질환의 대리 종말점 출현으로 판단할 수 있다.
- <110> RA 임상적 증상과 질환의 대리 종말점의 통상적 변수로는 당업자에게 공지된 관절 연화 측정의 "리치치 지수"(Ritchie Index; Ritchie 등., Q. J. Med., 37:393-406 (1968)), 부은 관절 수효, 매일 아침 관절 경화 기간, 약력, 시각 아날로그 등급에 따른 고통 강도 (Huskisson 등, Lancet, 2:1127-1131 (1974)), 및 환자의 항-염증제 및/또는 마취제 사용의 상대적 수준을 포함한다.
- <111> 대장균 추출물의 이중-가림 임상 실험의 결과에 따르면, 브락케르즈 등은 (Brackertz 등, J. Rheum. 16:19-23 (1989)) 당업자는 RA 백신의 임상 내성과 본 발명의 항체 조성물이 양호한 것으로 기대한다. 가장 가능한 부작용 (위장 염증과 같은)의 강도는 낮을 것으로 기대된다. 이 조성물의 독성은 혈액 화학 뿐 아닌 적혈구 용적률, 헤모글로빈, 혈소판 및 류마티스 인자 수준과 같은 변수 측정을 통한 주 기성 실험실 평가와 같은 통상 방법으로 추적할 수 있다.
- <112> C. 수동적 항체 치료법
- <113> 이상의 다른 곳에 기재된 대로, 최소한 초기 단계 RA는 dnaJp1과 같은 관절염성 단백질과 펩티드를 함유한 IgG 면역 복합체와 순환 단구의 지속적 부가에 의존해야 된다고 보여진다. 이 "부가"는 최소한 부분적으로는 관절염성 단백질, 펩티드, 및/또는 관련 항원이 순환으로 탈출함을 방지하는 충분한 항체, 특히 IgA를 생산하는 GI 면역 체계 실패로 가능하다.
- <114> 따라서, 본 발명의 다른 치료방법은 초기 단계 RA를 갖거나 질환이 예정된 개인에게 항체를 도입시키는 것으로 추진된다. 바람직하게는, 이러한 항체 치료는 본 발명 백신 투여로 위에서 기술한 백신화 방법안의 보조로 사용한다. 이러한 항체는 앞서 기술한 바대로 생산하고, 이 경우, 바람직하게는 단클론성 항체이며 장내로, 바람직하게는 장용제피 정제 형태로 투여한다. 이와 다르게, 항체는 이하 기술한 대로 젯에서 생산한다.
- <115> 사용할 항체는 dnaJ 단백질 또는 dnaJp1 펩티드에 특이한 것이다 (이하, "RA치료성 항체"). RA 치료성 항체는 천연, 합성 또는 재조합한 형태인 항원의 동물 면역에 의해 길러진다. 사용된 항체는 RA 감수성 배열을 (특히, dnaJp1의 부분으로) 발현하는 어느 생물체에서부터라도 유도할 수 있으나, 바람직하게는 장내 존재하며 펩티드를 히트 쇼크 단백질의 부분으로 발현하는 미생물에 대하여 길러진다. 가장 바람직하게는, 항체는 대장균으로부터 얻지만 (인간 GI 관에서 이 종류가 월등하므로), 항체가 다양한 종류의 생물체의 관절염성 단백질 및 펩티드에 특이성을 가지도록 상이한 미생물 종류의 항원 콕테일에 대하여 기를 수도 있다.
- <116> RA 치료성 항체를 젯에서 (치료상 "면역유"로 투여할 수 있는) 개발하려면 젯분비 포유류, 바람직하게는 소를 항원성 RA 감수성 배열 펩티드로 위에서 기술한 대로 면역시킨다. 우유는 인간 GI 관에서의 그 흡수성 때문에 RA 치료성 항체 생산에 바람직한 매질이다. 젯을 수합하여, 멸균화하고, 바람직하게는 저장에 위해 통상 기술로 동결 건조하고 건조 분유로 사용할 수 있다. 면역 분유는 가루 또는 그의 내용 (칼럼 8의 5 행에서 칼럼 14의 11 행까지) 여기에 참고로 편입된 미국 특허 번호 제 4,732,737 호에 일반적으로 기재된 대로 장내 경로에 의한 재구성 형태로 투여할 수 있다.
- <117> 본 발명은 완전히 기술되었고, 이의 실시는 이하 기재한 실시예에 따라 예시된다. 그러나, 이러

한 실시예는 부가한 청구항으로 정의되는 본 발명의 범위의 제한으로 해석되어서는 안된다.

실시예

- <118> [실시예 I]
- <119> 대장균의 클로닝, 발현 및 정제
- <120> 대장균 dnaJ 유전자 (배열 식별 번호 1 참조)를 포함하는 1.1-kb DNA 절편을 대장균의 dnaK와 dnaJ 유전자를 가지는 재조합 파지의 중합효소 연쇄 반응에 의해 증폭한다. 중합효소 연쇄 반응 생성물을 PCG808fX (New England Biolabs, Beverly, MA) 벡터의 Xba 1 위치에 서브클론 하고 말토스 결합 융합 단백질로 발현하여 아밀로스 칼럼에 의한 여과와 아밀로스 완충용액 내의 용리로 정제한다. 융합 단백질에 대한 토끼 항혈청을 이용하여 pUC 19 벡터 Xba 1 위치에 클론되어 발현시킨 rdnaJ를 정제한다. 이를 위해, 토끼 IgG를 고정화된 단백질 A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)로 정제하고 한천 지지 매질 (AFFI-GEL Hz, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA 의 등록 상표 상품)에 연결시킨다. 이후 가공하지 않은 세포 추출물을 친화성 칼럼에 통과시키고 pH 2.5의 글리신 완충용액으로 결합 단백질을 용리하여 dnaJ를 수득한다. 정제된 생성물의 폴리아크릴아미드 젤 전기 영동은 예상한 분자량 41 kD 의 유일한 밴드만을 나타내었다.
- <121> [실시예 II]
- <122> 초기 단계 RA 환자 림프구의 rdnaJ에 대한 반응
- <123> 치료받지 않은 초기 류마티드 관절염 (RA) 환자의 림프구를 혈액 (말초 혈액 림프구, "PBL")과 활막액에서 표준 방법 기술로 수득한다. 세포를 10 %의 미리 선별한 인간 AB 형 혈청으로 보충한 RPMI 1640 배양액 내의 정제된 재조합 대장균 dnaJ (10 µg/ml, 실시예 1에 기재한 대로 수득) 와 7 일간 배양한다. 10명의 대조군 (즉, RA 없는 인간)에서 얻은 림프구도 유사하게 처리한다. 배양의 마지막 16 시간 동안의 증식을 자극 지수 = (dnaJ 포함한 배양의 cpm) / (dnaJ 포함하지 않은 배양의 cpm) 로 나타낸다. 14 명의 초기 단계 RA 환자 PBL과, 8명의 초기 단계 RA 환자의 활막액 림프구의 세포 증식 반응을 기초로 하면, 활막액 림프구의 반응이 대조군 대상 림프구의 반응에 비해 약 2.3 배 큰 것에 비해 PBL의 증식 반응은 대조군 대상 림프구의 반응에 비해 약 3.6배 크다 (도 1 참조).
- <124> [실시예 III]
- <125> 초기 단계 RA 환자 림프구의 RA 감수성 배열 펩티드에 대한 반응
- <126> 초기 단계 RA 환자 림프구를 실시예 II에 기재한 방법안에 따른 RA 감수성 배열 펩티드 둘 중의 하나와 접촉시킨다. 사용한 펩티드는 야생형 배열 QKRAAYDQYGHAAFE 의 15 개 아미노산 합성 펩티드 또는 DERAAYDQYGHAAFE 배열의 15개 아미노산 합성 변이 펩티드이다.
- <127> 도 2 에서처럼, 실시예 II에서 사용된 동일한 기준의 측정에 의해 결과를 비교하면, PBL의 야생형 펩티드에 대한 반응은 변이 펩티드의 반응에 대한 PBL 반응에 비하여 5배 이상이고, 야생형 펩티드에 대한 대조군 대상 림프구의 반응에 비해서는 약 9배 크다.
- <128> [실시예 IV]
- <129> dnaJ에 대한 항체 결합의 억제
- <130> 미세적정 판을 재조합 dnaJ (10 µg/ml)로 도포한다. 초기 단계 RA 환자혈청 또는 대조군 대상의 혈청을 봉산 완충된 식염수로 1:100 으로 희석한다. 각 견본의 반을 실시예 III에 기술한대로 야생형 dnaJ 펩티드와 4℃에서 밤새 배양한다. 이후 결합된 혈청 견본을 dnaJ가 도포된 판에 가한다.
- <131> 4 시간 배양후, 항체 결합을 알칼린 포스파타제 표식된 염소 항-인간 IgG로 검출한다; 검출된 항원 결합 수준은 하기 식에 따라 결정한다:
- <132> 억제 % = 100 (1- 야생형 펩티드 포함시의 OD₄₆₀)
- <133> (야생형 펩티드 비포함시의 OD₄₆₀)
- <134> 도 3 에서처럼, rdnaJ에 대한 항체 결합은 야생형 RA 감수성 배열 펩티드에 의해, 대조군 혈청에서 측정된 억제보다 RA 혈청에서 약 3 배 정도 억제된다.
- <135> [실시예 V]
- <136> RA에 대한 유전성 예정의 면역측정에 의한 결정
- <137> rdnaJ에 대한 항체 반응은 ELISA로 측정한다. 100 µl rdnaJ (10 µg/ml)시료 또는 HLA DR 또는 DR41 호모지그우스(homozygous) 세포 (100 µg/ml)의 막 단백질로 ELISA 판을 4℃에서 밤새 도포한다. 이후 토끼 혈청의 다른 희석을 첨가하여 상온에서 2 시간 배양한다. BBS/0.2% Tween-20 으로 세척후, 결합한 항체를 1:1000 으로 희석한 알칼린 포스파타제 가교된-염소 항-토끼 IgG(Boehringer-Mannheim Biochemicals) 로 검출한다. 결과는 두 개 우물의 405nm OD 평균치로 도 4에 나타내었다.
- <138> 배열의 요약
- <139> 배열 식별 번호: 1은 대장균 K12 dnaJ를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 오픈 리딩 프레임이다.
- <140> 배열 식별 번호: 2는 RA 감수성 배열 변형체의 아미노산 배열이다.
- <141> 배열 식별 번호: 3은 RA 감수성 배열 변형체의 아미노산 배열이다.
- <142> 배열 식별 번호: 4는 박테리아 dnaJp1 펩티드의 아미노산 배열이다.

- <143> 배열 식별 번호: 5는 박테리아 dnaJpV 펩티드의 아미노산 배열이다.
- <144> 배열 식별 번호: 6은 박테리아 dnaJp2 펩티드의 아미노산 배열이다.
- <145> 배열 식별 번호: 7은 합성 인간 S1 HLA 펩티드의 아미노산 배열이다.
- <146> 배열 식별 번호: 8은 합성 인간 S2 HLA 펩티드의 아미노산 배열이다.
- <147> 배열 목록
- <148> (1) 일반 정보
- <149> (i) 출원인: 캘리포니아 대학교 이사회
- <150> (ii) 발명의 명칭: 류마토이드 관절염 병원 관련 관절염성 펩티드에 대항하는 면역 보호 유도에
유용한 백신 조성물과 방법
- <151> (iii) 배열 개수: 8
- <152> (iv) 해당 주소:
- <153> (A) 주소인: 로빈스, 베르리너 와 칼슨, 엘엘피
- <154> (B) 거리: 피구에로아 스트리트 201 N, 5층
- <155> (C) 시: 로스 엔젤레스
- <156> (D) 주: 캘리포니아
- <157> (E) 국가: 미국
- <158> (F) 우편번호: 90012-2628
- <159> (v) 컴퓨터 해독 형태:
- <160> (A) 중형: 플로피 디스크
- <161> (B) 컴퓨터: IBM PC 조화
- <162> (C) 작동 체계: PC-DOS/MS-DOS
- <163> (D) 소프트웨어: 판텐틴 보급형 #1.0, #1.25 버전
- <164> (vi) 현재 응용 데이터:
- <165> (A) 응용 번호: 미국
- <166> (B) 출원일:
- <167> (C) 분류:
- <168> (viii) 변호사/대리인 정보
- <169> (A) 성명: 베르리너, 로버트
- <170> (B) 등록 번호: 20,121
- <171> (C) 참고/적요 번호: 5555-426
- <172> (ix) 전화통신 정보:
- <173> (A) 전화: 213-977-1001
- <174> (B) 텔레팩스: 213-977-1003
- <175> (2) 배열 식별 번호:1 의 정보
- <176> (i) 배열의 특성:
- <177> (A) 길이: 1055 염기 쌍
- <178> (B) 형: 핵산
- <179> (C) 선형: 단선
- <180> (D) 토폴로지: 선형
- <181> (ii) 분자 형태: DNA(클로날)
- <182> (vii) 직접적 공급원:
- <183> (B) 클론: 대장균 K12 dnaJ 폴리뉴클레오티드 (cDNA)
- <184> (ix) 특징:
- <185> (A) 이름/열쇠: CDS
- <186> (B) 위치: 1..1054

<187>

(xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 1:

```

ATGGCTAAGC AAGATTATTA CGAGATTTTA GCGGTTTCCA AAACAGCGGA AGAGCGTGAA      60
ATCAGAAAAGG CCTACAAACG CCGGCCCATG AAATACCACC CGGACCGTAA CCAGGGTGAC      120
AAAGAGGGCT ATGGTCATGC TCGGTTTGAG CAAGGTGGCA TGGCGGGCGG CGGTTTTTGGC      180
GGCGGGCGCAG ACTTCAGCGA TATTTTTTGT GACGTTTTCG GCGATATTTT TGGCGGGCGA      240
CGTGGTCGTC AACGTGGGGC GCGCGGTGCT GATTTACGCT ATAACATGGA GGTCACCCTC      300
GAAGAAGCTG TACGTGGCGT GACCAAAGAG ATCGGCATTC CGACTCTGGA AGAGTGTCAC      360
GTTTGGCACC GTAGCGGTGC AAAACCAGGT ACACAGCGGC AGACTTGTCG GACCTGTGAT      420
GGTTCTGGTC AGGTGCAGAG GCGGCAGGGA TTCTTCGCTG RACAGCAGAC CTGTCAACAC      480
TGTCAGGGCC GCGGTACGCT GATCAAAGAT CCGTGTAACA AATGTGATGG TCATGGTCGT      540
CTTGAGCGCA GCAAAACGCT TCGGTTAAAA TCGCGGCAGG GGTGGACACT GGACACCGCA      600
TCCGTCTTGC GGGCGAAGGT GAAGCGGGCG AGCATGGCGC ACGGGCAGGC GATCTGTACG      660
TTCAGGTTCA GGTAAACAG CACCGGATTT TCGAGCGTGA AGGCAACAAC CTGTATTGGC      720
AAGTCCGAT CAACTTCGCT ATGGCGCGGC TGGGTGGCGA AATCGAAGTA CGGACCGTTG      780
ATGGTCGGCT CAAACTGAAA GTGCGTGGCG AAACCCAGAC CGGTAAGCTA TCCGSTATGC      840
GCGGTAAAAG CGTCAAGTCT GTCCGCGGTG GCGCACAGGG TGATTTGCTG TCGCGCGTTG      900
TCGTGAAAC ACCCGTAGCC CTGAACGAAA GGCAGAAACA GGTGCTGCAA GAGGTGCAAG      960
AAAGATTCCG TGGCCCAACC GCGCAGCACA ACAGCCCGCG CTCAAAGACC TTCTTTGATG     1020
GTGTGAAGAA GTTTTTTGAC GACCTGACCC GTTAA                                1055

```

<189>

(2) 배열 식별 번호 2 의 정보

<190>

(i) 배열의 특성:

<191>

(A) 길이: 아미노산 5개

<192>

(B) 형: 아미노산

<193>

(C) 선형: 단선

<194>

(D) 토폴로지: 선형

<195>

(ii) 분자 형태: 펩티드

<196>

(vii) 직접적 공급원:

<197>

(B) 클론: RA 감수성 배열 변형체

<198>

(ix) 특징:

<199>

(A) 이름/열쇠: 펩티드

<200>

(B) 위치: 1..5

<201>

(xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 2:

<202>

Gln Lys Arg Arg Ala

<203>

1 5

<204>

(2) 배열 식별 번호 3 의 정보

<205>

(i) 배열의 특성:

<206>

(A) 길이: 아미노산 5개

- <207> (B) 형: 아미노산
- <208> (C) 선형: 단선
- <209> (D) 토폴로지: 선형
- <210> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <211> (vii) 직접적 공급원:
- <212> (B) 클론: RA 감수성 배열 변형체
- <213> (ix) 특징:
- <214> (A) 이름/열쇠 : 펩티드
- <215> (B) 위치: 1..5
- <216> (xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 3:
- <217> Gln Arg Arg Ala Ala
- <218> 1 5
- <219> (2) 배열 식별 번호 4 의 정보
- <220> (i) 배열의 특성:
- <221> (A) 길이: 아미노산 15개
- <222> (B) 형: 아미노산
- <223> (C) 선형: 단선
- <224> (D) 토폴로지: 선형
- <225> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <226> (vii) 직접적 공급원:
- <227> (B) 클론: 면역성 dnaJ 펩티드
- <228> (ix) 특징:
- <229> (A) 이름/열쇠: 펩티드
- <230> (B) 위치: 1..15
- <231> (xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 4:
- <232> Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu
- <233> 1 5 10 15
- <234> (2) 배열 식별 번호 5 의 정보
- <235> (i) 배열의 특성:
- <236> (A) 길이: 아미노산 5개
- <237> (B) 형: 아미노산
- <238> (C) 선형: 단선
- <239> (D) 토폴로지: 선형
- <240> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <241> (vii) 직접적 공급원:
- <242> (B) 클론: 면역성 dnaJ 펩티드
- <243> (ix) 특징:
- <244> (A) 이름/열쇠: 펩티드
- <245> (B) 위치: 1..15
- <246> (xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 5:
- <247> Asp Glu Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu
- <248> 1 5 10 15
- <249> (2) 배열 식별 번호 6 의 정보
- <250> (i) 배열의 특성:
- <251> (A) 길이: 아미노산 15개

- <252> (B) 형: 아미노산
- <253> (C) 선형 : 단선
- <254> (D) 토폴로지: 선형
- <255> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <256> (vii) 직접적 공급원:
- <257> (B) 클론: 면역성 dnaJp2
- <258> (ix) 특징:
- <259> (A) 이름/열쇠 : 펩티드
- <260> (B) 위치: 1..15
- <261> (xi) 배열 설명 : 배열 식별 번호 6:
- <262> Val Leu Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly
- <263> 1 5 10 15
- <264> (2) 배열 식별 번호 7 의 정보
- <265> (i) 배열의 특성:
- <266> (A) 길이: 아미노산 5개
- <267> (B) 형: 아미노산
- <268> (C) 선형 : 단선
- <269> (D) 토폴로지: 선형
- <270> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <271> (vii) 직접적 공급원:
- <272> (B) 클론: S1
- <273> (ix) 특징:
- <274> (A) 이름/열쇠: 펩티드
- <275> (B) 위치: 1..15
- <276> (xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 7:
- <277> Gln Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr Gly
- <278> 1 5 10 15
- <279> (2) 배열 식별 번호 8 의 정보
- <280> (i) 배열의 특성:
- <281> (A) 길이: 아미노산 5개
- <282> (B) 형: 아미노산
- <283> (C) 선형: 단선
- <284> (D) 토폴로지: 선형
- <285> (ii) 분자 형태: 펩티드
- <286> (vii) 직접적 공급원:
- <287> (B) 클론: S6
- <288> (ix) 특징:
- <289> (A) 이름/열쇠: 펩티드
- <290> (B) 위치: 1..15
- <291> (xi) 배열 설명: 배열 식별 번호 8:
- <292> Lys Asp Leu Leu Glu Gln Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys
- <293> 1 5 10 15

(57) 청구의 범위

청구항 1

약제학상 허용되는 담체 내에 배열 식별 번호 4의 아미노산 서열을 가지는 분리 정제된 박테리아

dnaJp1 펩티드를 포함하며, 호스트의 관절염성 펩티드에 대항하는 면역 보호 유도에 유용한 백신.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
dnaJp1 펩티드가 합성 또는 재조합 펩티드인 백신.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
dnaJp1 펩티드 외에 dnaJ 폴리펩티드를 더 포함하는 백신.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
dnaJ 폴리펩티드가 합성 또는 재조합 폴리펩티드인 백신.

청구항 5

제 3 항에 있어서,
dnaJ 폴리펩티드가 인간 dnaJ 단백질에서 발견되는 dnaJ 폴리펩티드인 백신.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
에스체리치아, 락토코커스, 클렙시엘라, 프로테우스, 및 살모넬라 속으로 구성된 1 종 이상의 속
에서 선택된 박테리아에 의하여 dnaJp1 펩티드가 제조되는 백신.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
면역자극성 화합물을 더 포함하는 백신.

청구항 8

제 7 항에 있어서,
면역자극성 화합물이 TGF- α 인 백신.

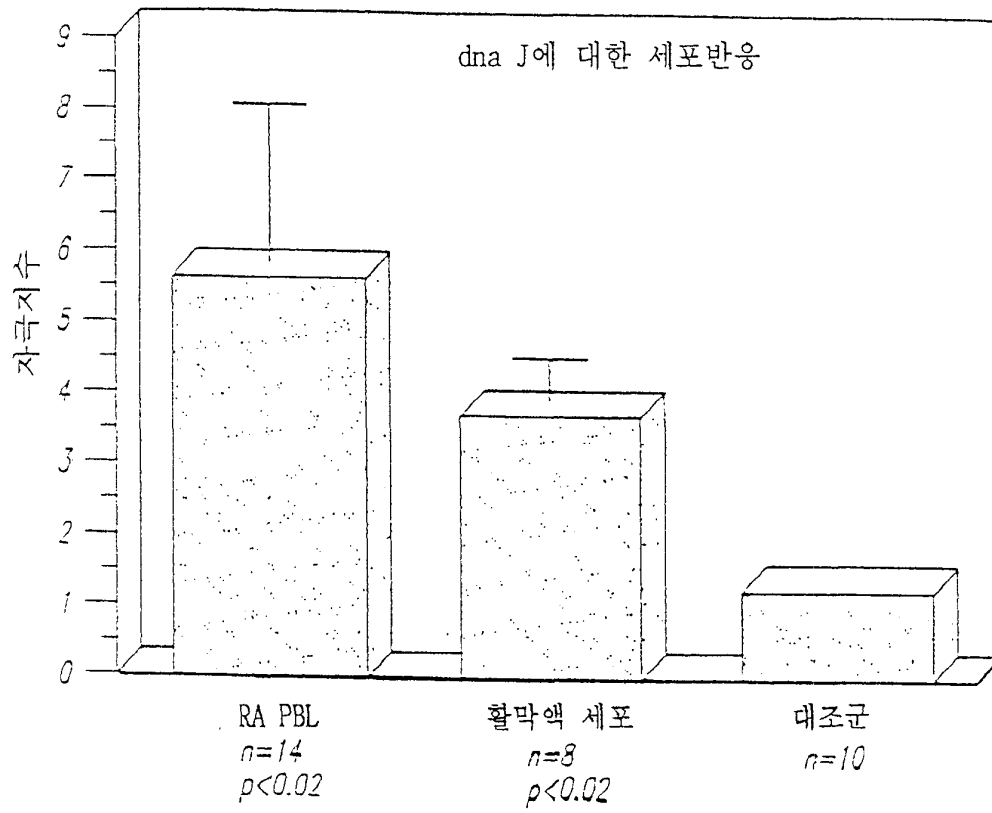
청구항 9

배열 식별 번호 4의 아미노산 서열을 가지는 박테리아 dnaJp1 펩티드를 코딩하는 재조합 유전자
발현 벡터를 포함하며, 호스트의 관절염성 펩티드에 대항하는 면역 보호 유도에 유용한 백신.

요약

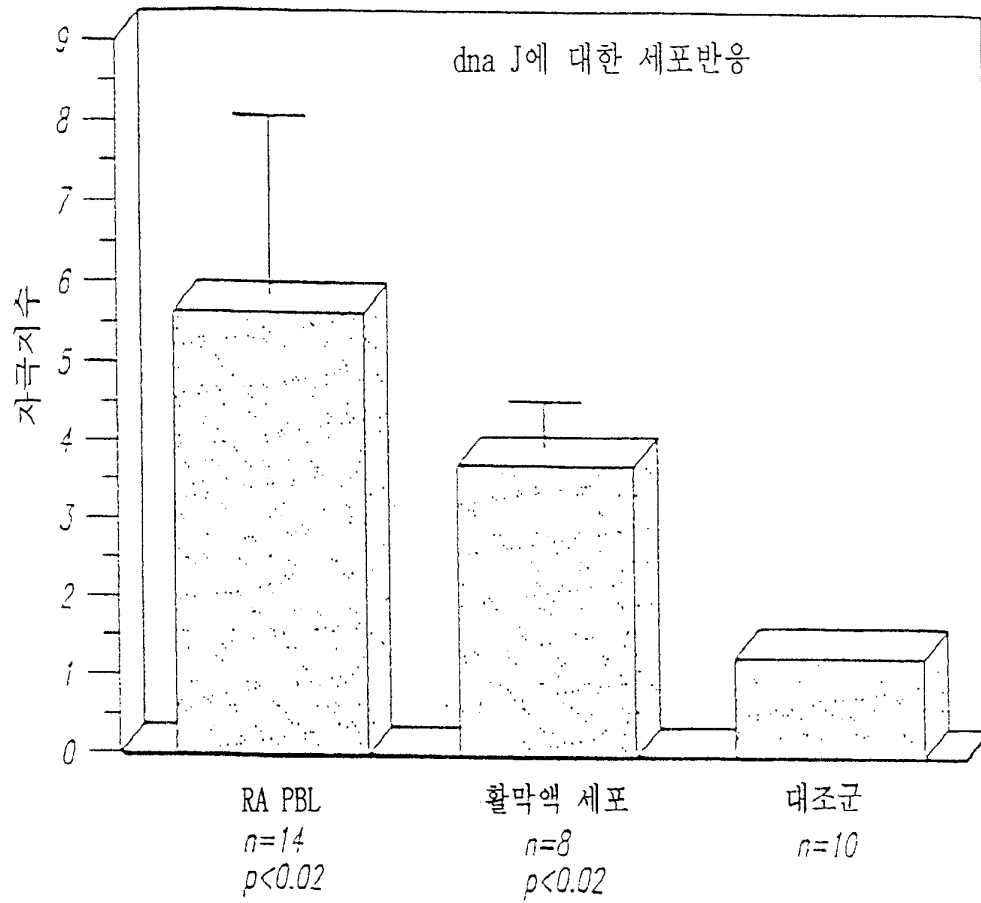
류마티오이드 관절염 병원 관련 관절염성 펩티드에 대항하는 호스트 내의 면역 보호 유도에 유용한
백신 조성물을 공표하였다. 각 백신 조성물은 항원성 dnaJp1 펩티드와 (펩티드 또는 펩티드를 코딩하는
폴리뉴클레오티드를 포함함으로써), 임의로, 그의 미생물 dnaJ 단백질 및/또는 인간 호몰로그의 펩티드
절편을 공급한다. 류마티오이드 관절염의 발병이 예정된 사람을 확인하는 방법과 발명의 백신을 사용하는
방법 역시 공표되었다.

대표도

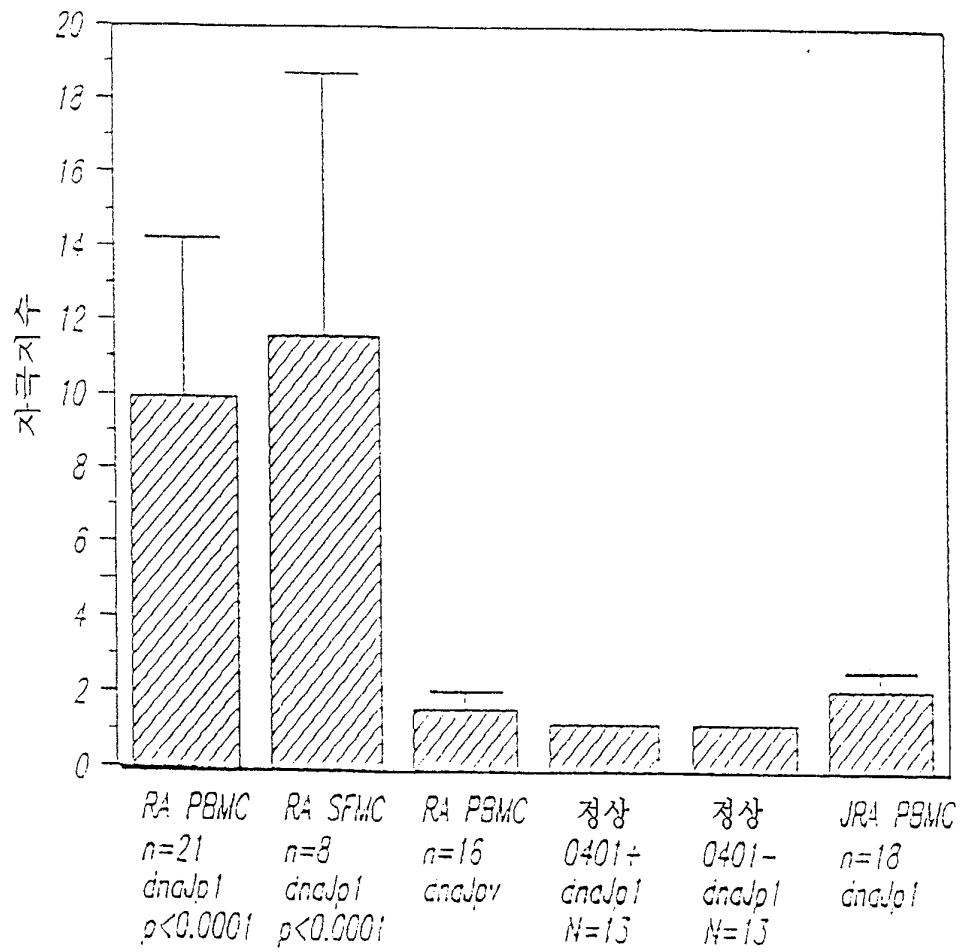


도면

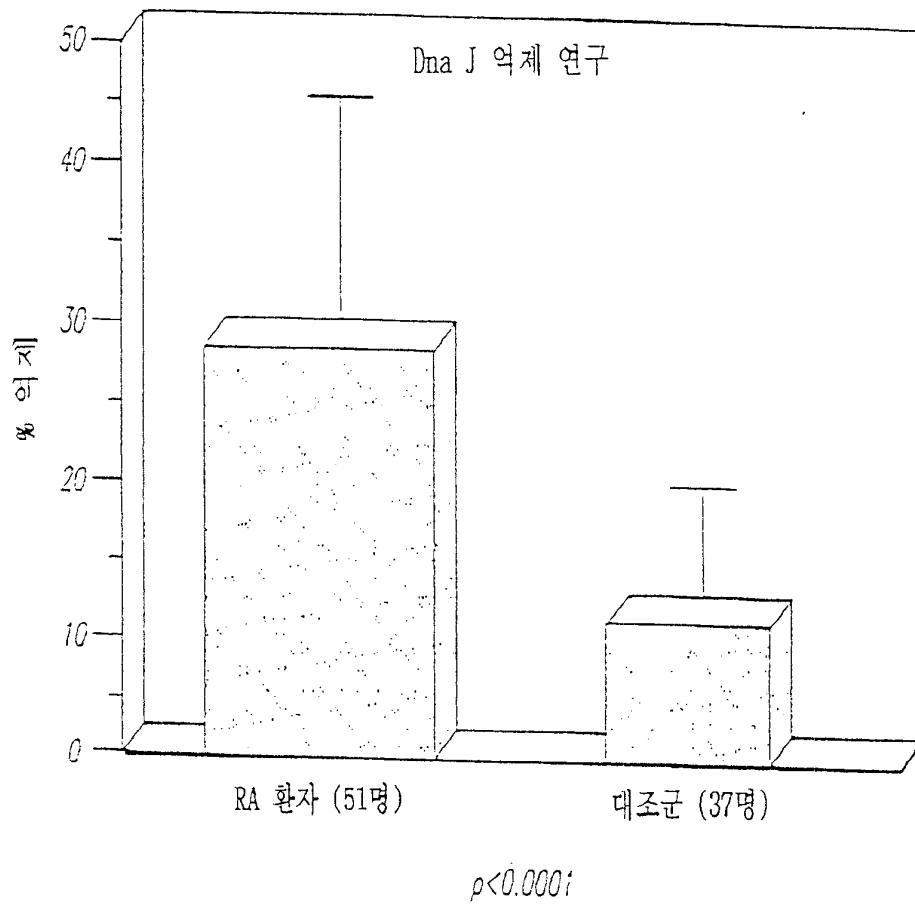
도면1



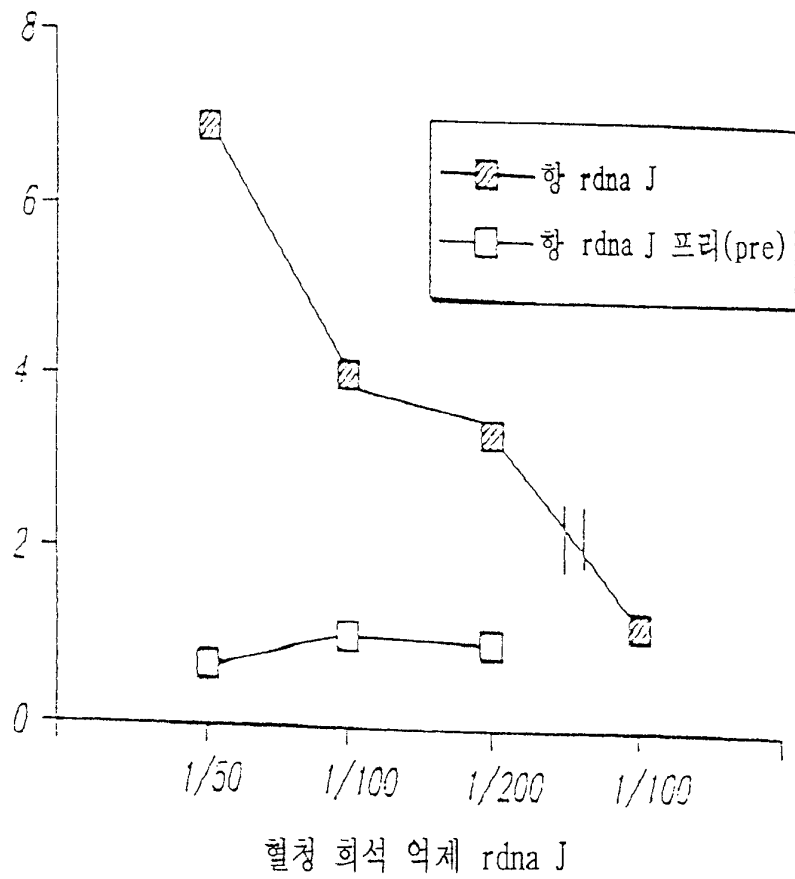
도면2



도면3



도면4



도면5

HLA-DRB1 형 수여자	펩티드				
	<i>dnaJp1</i>	<i>dnaJp2</i>	<i>dnaJpV</i>	<i>S1</i>	<i>S6</i>
<i>DRB1*0401</i> (환자)	1.07	0.16	0.04	0.09	0.19
<i>DRB1*0401</i> (정상인 경우)	1.06	0.18	0.03	0.08	0.17
<i>DRB1*0407</i> (정상인 경우)	1.00	0.19	0.14	0.11	0.22