



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 320773

(13) B1

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964910	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.04.24 PCT/US95/04896
(22)	Inng.dag	1996.11.19	(85)	Videreføringsdag	1996.11.19
(24)	Løpedag	1995.04.24	(30)	Prioritet	1994.05.20, US, 246988
(41)	Alm.tilgj	1996.11.19			
(45)	Meddelt	2006.01.23			
(73)	Innehaver	The Regents of the University of California , 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, CA94612-3350 OAKLAND, US			
(72)	Oppfinner	Dennis A, Carson, Del Mar, CA, US Albani Salvatore, San Diego, CA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Isolert polypeptid og vektor omfattende dette, artrittogent peptid av polypeptidet og sammensetning omfattende dette for forebyggelse og behandling av reumatoid artritt.			
(56)	Anførte publikasjoner	Albani et al., J. Clin. Invest, vol 89., 1992, 327-331 Albani et al., J. Pediatrics, april 1994, 124 (4):561-565 US 4732757			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåter nyttige for behandling eller forhindring av reumatoid artritt (RA) er beskrevet. Hver fremgangsmåte er nyttig for å begrense eksponeringen av det systemiske immunsystemet til et menneske overfor RA artrittogene peptider tilstede i personens mave-tarTn (GI) kanal. En fremgangsmåtene reduserer populasjonen av artrittogene peptidproduserende bakterier i GI kanalen og erstatter deretter disse bakteriene med bakterier som ikke kan produsere artrittogene peptider. Fremgangsmåter for både passiv og aktiv immunisering av et menneske overfor artrittogene peptider er beskrevet, samt en fremgangsmåte for identifisering av personer som har en predisposisjon for å utvikle RA.

Foreliggende oppfinnelse vedrører kontroll og forhindring av autoimmun sykdom, spesielt reumatoid artritt. Oppfinnelsen vedrører spesielt isolert polypeptid og vektor omfattende dette, artrittogent peptid kodet av polypeptidet og sammensetning omfattende dette for forebyggelse og behandling av reumatoid artritt.

5

I mennesker pleier autoimmune sykdommer så som reumatoid artritt å være assosiert med bestemte HLA spesifisiteter. Reumatoid artritt (RA) antas å være assosiert på et genetisk nivå med klasse II HLA haplotypene DW4, DW14, DW15 (alle med DR4 spesifisitet) og/eller DR1. Hver av disse haplotypene innbefatter en aminosyresekvens som for tiden blir referert til som "mottagelighetssekvens" (nedenfor, "RA mottagelighetssekvens; se SEQ ID NO: 1 og 2). Den RA mottagelige sekvensen er kjent for å variere med en aminosyre, dvs. QRRAA og QKRAA (nedenfor, "Q(R/K)RAA"). Mer enn 90% av pasientene med seropositiv RA er også blitt funnet å ha HLA DR antigener med RA mottagelig sekvens i den tredje hypervariable regionen til molekylet.

15

QRRAA varianten til den mottagelige sekvensen er blitt identifisert på HLA haplotypene DW14, DW15 og DR1. QKRRA varianten er blitt identifisert på HLA haplotypen DW4. Homologer av variantene er også blitt identifisert i Epstein-Barr virus glykoprotein gp110, samt i dnaJ varmesjokk proteiner fra *Escherichia coli*, og i de bakterielle artene *Klebsiella*, *Proteus Salmonella* og *Lactococcus*.

20

Basert på vesentlig grad av konservering blant prokaryote dnaJ proteiner er det ventet at den RA mottagelige sekvensen er til stede i dnaJ produsert av andre mikrobielle arter (se for eksempel J. Bact., 175:1637-1644 (1993)). Basert på rapporter angående sekvenshomologi blant eukaryote dnaJ proteiner med andre eukaryote og prokaryote dnaJ proteiner vil det ikke nødvendigvis være overraskende å oppdage den RA mottagelige sekvensen i eukaryotisk dnaJ til tross for at det enda ikke er blitt identifisert slike proteiner (se for eksempel Silver, et al. Cell, 74:5-6 (1993)).

25

I 1992 ble en rapport publisert som understøttet teorien om at dnaJ proteinet spilte en rolle i forløpet av reumatoid artritt (Albani, et al., J. Clin. Invest., 89:327-331 (1992)). Omfatter denne uttrykt og renset rekombinant dnaJ (rdnaJ). rdnaJ ble spesifikt bundet av antisera dannet i kaniner mot den RA mottagelige sekvensen fra det DW4 proteinet. Antisera dannet mot rdnaJ bandt også intakt DW4 protein samt DW4 homozygote B lymfoblaster.

35

To hypoteser angående rollen til den RA mottagelige sekvensen på HLA DR1 og DW4 var til stede på tidspunktet for ovennevnte rapport. Den første postulerte at den RA mottagelige sekvensen kontrollerte bindingen av et ukjent artrittogent peptid. Den postulerte at sekvensen bandt antigenreseptorer på T celler og innvirket følgelig på ekspansjonen eller delesjonen av en bestemt T celle populasjon. Under siste hypotesen antas RA mottagelighetssekvensen å være den del av en peptidaminosyresekvens presentert for T cellene. Den aminosyresekvensen blir sannsynligvis gjenkjent av T cellene som ikke egne i stedet for egne. Under begge teorier antas forløpet av RA å utgå i det minste delvis fra en svikt som det lokale immunsystemet i tarmen har til å produsere sekretoriske immunoglobuliner ("IgA") overfor skadelige mikroorganismer.

Med funnet av at mikroorganismer produserer peptider med RA mottagelig sekvens fremkom en tredje teori som postulerte at den autoimmune responsen involvert i RA fremkom som et resultat av vertens immunrespons overfor mikrobielle RA mottagelighets sekvenspeptider. Basert på denne teorien ble en terapeutisk modalitet foreslått som kunne vaksinere mennesker overfor RA ved administrering av syntetiske konjugater av immunogene former av RA mottagelighetssekvens peptider (se publisert PCT søknad WO 9014835 (inngitt 5/31/90), Carson et al., oppfinnere). Effektiviteten til foreslåtte vaksiner er enda ikke blitt testet i mennesker.

En annen terapeutisk modalitet for kontrollering av immunresponsen overfor bakterielle antigener antatt å være implisert i forløpet av RA er blitt foreslått i US-PS 4.732.757 til Stolle et al. Stolle et al. foreslo administrering av IgG antistoffer dannet i kumelk mot et bredt spekter av intakte bakterier som vanligvis er til stede i human mage-tarm kanal. IgG testet av Stolle et al. ble dannet mot en blanding av intakte organismer uten målsøking av spesifikke bakterielle antigener. Dette patentet ble utstedt før identifikasjonen av den RA mottagelige sekvensen i visse bakterielle varmesjokkproteiner, inkludert dnaJ. Antisera beskrevet av Stolle et al. var derfor ikke rettet mot RA mottagelighetssekvens peptider.

Ingen av disse metodene for behandling av RA målsøkte spesifikt artrittogene peptider før peptidene blir presentert for det systemiske immunsystemet til en RA pasient. Det er derfor et behov for en behandling som ikke bare vil lindre systemiske responser til en RA pasient overfor artrittogene peptider, men som også vil forhindre eksponering av pasienten overfor artrittogene peptider gjennom frigivelse av slike peptider fra pasientens GI kanal til i systemisk sirkulasjon. En slik behandling vil ideelt sett bli gitt før pasienten utvikler RA eller i tidlige stadier av sykdommen og det eksisterer derfor et

behov for en fremgangsmåte for identifisering av personer som er genetisk predisponerte for utvikling av RA.

Foreliggende oppfinnelse vedrører slike behov.

5

Foreliggende oppfinnelse vedrører således et isolert polynukleotid, kjennetegnet ved at det koder for et peptid bestående av en aminosyresekvens utvalgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO: 5 og slike artrittogene peptider.

- 10 Oppfinnelsen angår videre en sammensetning, kjennetegnet ved at det omfatter et polynukleotid og en fysiologisk akseptabel bærer og sammensetninger omfattende et artrittogent peptid sammen med en fysiologisk akseptabel bærer.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan være en vaksinesammensetning.

15

Oppfinnelsen angår videre en genekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter et polynukleotid operasjonelt bundet til en kontrollsekvens og en sammensetning omfattende vektoren.

- 20 Til slutt angår oppfinnelsen anvendelse av polynukleotidet, peptidet eller sammensetningene ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for å behandle eller forebygge reumatoid artritt hos et individ.

- 25 I foreliggende oppfinnelse vil angivelsen "artrittogene peptider", hvis ikke annet er angitt, refererer til proteiner og peptidfragmenter derav som inneholder RA mottagelighets sekvens, spesielt med mikrobiell opprinnelse.

- 30 I et aspekt av oppfinnelsen, dannes IgG, IgA (fortrinnsvis i melk) overfor artrittogene peptider (fortrinnsvis oppnådd fra rdnaJ) og administreres (fortrinnsvis ved enterale veier og fortrinnsvis som Fab fragmenter av Ig) til en RA pasient. I et annet aspekt av oppfinnelsen blir bakterier som har evne til å produsere artrittogene peptider i stor grad eliminert fra mage-tarm kanalen til en RA pasient og deretter erstattet med bakterier omkonstruert for å ikke kunne uttrykke den RA mottagelige sekvensen.

35

Detaljer angående foretrukken utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er angitt i vedlagte tegninger og beskrivelse nedenfor. Når detaljer angående oppfinnelsen er kjent vil mange ytterligere innovasjoner og forandringer være innlysende for fagfolk innenfor dette området.

5

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 kvantifiserer proliferasjon av dyrkede lymfocytter fra 22 pasienter med tidlig, ubehandlet RA ("tidlig stadium" RA) etter eksponering av cellene for rdnaJ. Responsene vist ved kolonner i grafen i figur 1 blir uttrykt med hensyn på en lymfocytt stimuleringsindeks; dvs. cpm detektert i kulturer med rdnaJ/cpm detektert i kultur uten dnaJ. Kontrollkulturen består av lymfocytter fra mennesker uten RA.

Figur 2 kvantifiserer proliferasjon av dyrkede lymfocytter fra 26 RA pasienter i tidlig stadium etter eksponering av cellene for et syntetisk dnaJ peptid med aminosyresekvensen QKRAAYDQYGHAAFE eller et mutant dnaJ peptid med aminosyresekvensen DERAAYDQYGHAAFE. Kontrollkulturen består av lymfocytter fra mennesker uten RA.

Figur 3 angir resultater av en inhibisjonsstudie for inhibisjon av anti-dnaJ antistoffer produsert i atskilte seraprøver fra 51 RA pasienter i tidlig stadium ved rdnaJ. Prosent inhibisjon vist ved kolonner i grafen i figur 2 blir uttrykt i følgende formel:

$$\% \text{ inhibisjon} = 100 \frac{(I-OD_{460} \text{ med rdnaJ})}{(OD_{460} \text{ uten rdnaJ})}$$

Kontrollsera ble oppnådd fra mennesker uten RA.

Figur 4 angir in vitro antistoff responsen av kaninsera overfor rdnaJ målt ved en enzymkoplet immunosorbent analyse. Resultatene er uttrykt som gjennomsnittlig OD ved 405 nm av duplikate brønner.

I. TEORI IFØLGE OPPFINNELSEN

Ett funn som ligger til grunn for denne oppfinnelsen er at humane pasienter med tidlig stadium av RA har unormalt høye cellulære immunresponser overfor et mikrobielt peptid med RA mottagelig sekvens. Denne observasjonen fører til den konklusjonen at RA blir aktivert av immunresponser overfor sterile fragmenter av bakterielle antigener

som blir transportert til leddene av monocytter. Molekylene involvert i disse immunresponsene er sannsynligvis kryssreaktive med RA mottagelighetssekvensen på HLA DW4 og DR1, spesielt førstnevnte.

- 5 Til tross for at oppfinnelsen ikke er begrenset til eller avhengig av følgende teori som vedrører patogenesen av RA, er teorien gitt som en mulig forklaring på hvorfor og hvordan immunmekanismen som sannsynligvis er involvert i RA beskrives. Granuleringsvevet til reumatoid pannus blir fylt med celler fra monocyttisk linje. I mennesker (i forhold til lavere dyr) deles ikke disse vevsmakrofagene effektivt, og må
- 10 erstattes kontinuerlig fra sirkulerende blodmonocytter. Man kan anta at immunkompleksene inneholdende dnaJ og IgG antistoff overfor artrittogent peptid først dannes i tarmens slimhinneregion, og blir så plukket opp av sirkulerende blodmonocytter med Fc reseptorer.
- 15 Noen av disse antigenbelastede monocyttene kan deretter migreres systemisk til leddene. T lymfocytter fra individer med RA mottagelighetssekvens er sannsynligvis blitt opplært til å hyper reagere overfor dnaJ slik at små mengder av antigen vil være tilstrekkelig for å initiere leddbetennelse. Meget små mengder av et vanlig bakterielt antigen blir kanskje aldri detektert ved klassiske immunologiske metoder. Videre, når
- 20 etablert kan synovitis bli vedvarende ved ytterligere utvikling av antistoffer mot immunkompleksbundet IgG (reumatoide faktorer), og degraderingskomponenter i brusk og bindevev. I det minste de tidlige stadiene av reumatoid artritt kan avhenge av kontinuerlig tilførsel av sirkulerende monocytter med IgG immunkomplekser inneholdende artrittogene peptider.
- 25 Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er konstruert for å lindre eller forhindre immunrespons overfor artrittogene peptider beskrevet ovenfor. I en tilnærming blir tidlig stadium RA pasienter eller pasienter med høy risiko for utvikling av RA passivt immunisert med antistoffer som spesifikt vil binde artrittogene peptider, fortrinnsvis
- 30 antistoffer produsert i melk fra pattedyr. I en annen tilnærming blir et ikke-absorberbart antibiotika administrert til pasienter for å redusere eller eliminere endogen bakteriell populasjon i mage-tarm (GI) kanalen. Denne populasjonen blir deretter erstattet i GI kanalen med bakterier som er blitt omkonstruert slik at de ikke har evne til å uttrykke RA mottagelig sekvens. Begge tilnærmingene kan bli supplementert med en aktiv
- 35 immuniseringsprotokoll hvor immunogene artrittogene peptider blir administrert som en vaksine til pasienten, alene eller i kombinasjon med immunstimulerende midler.

II. REAGENSER OG FREMGANGSMÅTER FOR ANVENDELSE VED IDENTIFISERING AV EGNEDE KANDIDATER IFØLGE OPPFINNELSEN

5

A. KARAKTERTREKK TIL EGNEDE KANDIDATER

Hovedkandidater er individer med tidlig RA stadium eller som er predisponerte for å utvikle sykdom. Et individ kan følgelig bli betraktet å være "predisponert" for å utvikle
10 RA når deres HLA molekyler inneholder RA mottagelighetssekvens.

Imidlertid må man være oppmerksom på at visse "normale" individer (dvs. som ikke har en familiebakgrunn for RA og som ikke utvikler dette selv) kan til tross for dette ha endogene HLA molekyler som bærer den RA mottagelige sekvensen. Men til tross for
15 tilstedeværelse av RA mottagelige sekvenser i disse individene, trenger ikke deres cellulære immunresponser overfor dnaJ være forskjellig i absolutt størrelse fra responsene til individer hvor HLA molekylene som ikke bærer mottagelighetssekvensen for RA.

20 Det kan antas fra foregående observasjon av utvikling av RA hos personer hvor HLA molekylene bærer RA mottagelighetssekvensen er resultatet ikke bare en cellulær immunrespons, men også av en humoral immunrespons. Med andre ord er det mest sannsynlig at utvikling av RA ikke bare er assosiert med opplæring av T celle repertoaret til å gjenkjenne RA mottagelighetssekvensen som fremmed, men også det at
25 produksjonen i RA lider av anti-RA mottagelighetssekvens antistoffer (se, eksempel IV og figur 3 som viser inhibisjon av antistoff binding i lymfocytter fra RA pasienter med dnaJ, hvor størrelsen på inhibisjonen vesentlig overskrider den som blir observert i lymfocytter fra normale individer). Individer hvor HLA antigenene bærer RA mottagelig sekvens og som produserer anti-RA mottagelig sekvens vil antistoffene, ifølge denne
30 beskrivelsen, bli betraktet å være "predisponert" for RA. En screeningsmetode for identifikasjon av individer med RA i tidlig stadium og som er predisponert for dette ("RA screeningsmetoden") er beskrevet nedenfor.

35 B. RA SCREENINGSMETODE

RA screeningsmetoden vil generelt omfatte følgende trinn (a) detektere om RA mottagelighetssekvensen er tilstede på HLA molekylene fra et individ (spesielt DW4

molekyler), og (2) detektere om lymfocytter fra individet produserer antistoffer i respons til å bli eksponert for en immunogen form av et artrittogent protein eller peptid.

Alternativt kan screeningsmetoden bare omfatte sistnevnte trinn fordi hvis individets lymfocytter produserer antistoffer i respons til å bli eksponert for et RA

- 5 mottakelighetssekvens protein kan individet antas å ha større sannsynlighet for å utvikle av RA. HLA molekyler som kan bære RA mottakelighetssekvensen i et gitt individ vil samlet bli referert til nedenfor som "HLA-DW4" molekyler selv om betegnelsen kan omfatte et hvilket som helst HLA molekyl som kan bære RA mottakelighetssekvensen.

- 10 For å utføre RA screeningsmetoden vil en biologisk prøve som kan være et hvilket som helst fluid eller vev som sannsynligvis inneholder lymfocytter, men vil fortrinnsvis være perifert blod (hel blod) eller synovialt fluid ("lymfocytprøve") vil bli oppnådd ved anvendelse av konvensjonelle teknikker fra individer som skal bli screenet for RA. For å bestemme om individets HLA molekyler bærer RA mottakelighetssekvensen kan
- 15 konvensjonelle HLA typingsteknikker velkjente for fagfolk innenfor dette området bli anvendt. Det er å bemerke i dette henseendet at nukleotidet og aminosyresekvensene for de fleste kjente HLA antigenene er blitt meget godt karakterisert og kan lett bli identifisert (se for eksempel Marsh et al., Tissue Antigens, 37:181-189 (1991), og Bodmer, et al., Tissue Antigens, 37:97-105 (1991)).

- 20 For eksempel, med referanse til polynukleotidsekvensene rapportert av Marsh and Bodmer, et al., og/eller polynukleotidsekvensene innbefattet i sekvenslisten, kan fagfolk innenfor dette området konstruere oligonukleotidprober som vil hybridisere til målpolynukleotidsekvenser for deteksjon av spesifikke HLA antigener i en
- 25 lymfocytprøve. Teknikker for konstruksjon av egnede prober og utførelse av hybridiseringsteknikker er beskrevet heri og kan bli anvendt av fagfolk innenfor dette området uten unødig eksperimentering.

- Vanligvis blir HLA typing utført serologisk, dvs. ved anvendelse av standardiserte
- 30 antisera (med definert spesifisitet) for en lymfocytprøve sammen med komplement og observering av om testcellene blir drept. HLA typing kan også bli utført ved andre konvensjonelle immunologiske teknikker så som "blandet lymfocytreaksjon" hvor testlymfocytene blir blandet med B lymfocytene med definert HLA spesifisitet. I den blandede lymfocytreaksjonen blir testceller med spesifisitet som er forskjellig fra B
- 35 cellene til kjente HLA typer stimulert og proliferert. Ytelsen til alle disse HLA typingsteknikkene hører inn under det som er kjent for fagfolk innenfor dette området.

Tilstedeværelse av RA mottagelighetssekvens på HLA molekylerne til et individ kan også bli forstyrret av binding av anti-dnaJ eller anti-artrittogene peptidantistoffer av cellene i lymfocytprøven. På grunn av at klasse D HLA molekylerne også er til stede på makrofager, monocytter og noen aktiverte T celler kan antistoff binding på disse cellene
5 også oppstå ved spesifikke epitoper.

Artrittogene peptider kan bli detektert i en lymfocytprøve ved anvendelse av anti-artrittogene peptidantistoffer i enten væske eller fast fase immunoanalyse formater (når bundet til en bærer). Antistoffer som kan anvendes i disse formatene kan bli produsert
10 som beskrevet nedenfor.

Eksempler på velkjente bærere som anvendes i fastfase analyseformater innbefatter glass, polystyren, polypropylen, polyetylen, dekstran, nylon, amylaser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, agaroser og magnetitt. Naturen til bæreren kan
15 være enten oppløselig eller uoppløselig i foreliggende oppfinnelse.

Eksempler på typer av immunoanalyser som kan anvende anti-artrittogene antistoffer ifølge oppfinnelsen er konkurrerende og ikke-konkurrerende immunoanalyser i enten et direkte eller indirekte format. Eksempler på slike immunoanalyser er ELISA,
20 radioimmunoanalyse (RIA) og sandwich (immunometrisk) analyse. Binding av artrittogene peptider ved anvendelse av antistoffene ifølge oppfinnelsen kan bli utført ved anvendelse av immunoanalyser som blir kjørt enten forover, motsatt eller samtidig, inkludert immunhistokjemiske analyser på fysiologiske prøver. Fagfolk innenfor dette området vet, eller kan lett oppdage andre immunoanalyseformater uten unødige
25 eksperimentering.

Protokollen beskrevet i eksempel 5 illustrerer hvordan RA screeningsmetoden kan bli utført ved immunoanalyse (ved en enzymkoblet immunadsorbent analysen eller ELISA). I en foretrukket utførelsesform av RA screeningsmetoden blir lymfocytter oppnådd ved
30 konvensjonelle metoder fra personer som antas å ha RA i tidlig stadium eller er predisponert for sykdom dyrket og eksponert for immunogene RA mottagelighetspeptider, fortrinnsvis rdnaJ (produsert som beskrevet nedenfor). Cellulær immunrespons til dyrkede lymfocytter overfor immunogen dnaJ blir deretter detektert. Alternativt kan protokollen bli utført som en inhibisjonsstudie som beskrevet i eksempel
35 IV, dvs. hvor en reduksjon i antistoffbinding gjennom preinkubasjon med dnaJ peptid blir detektert.

Anti-artrittogene peptidantistoffer kan også merkes. Det eksisterer mange forskjellige markører og fremgangsmåter for merking kjent for fagfolk innenfor dette området. Eksempler på typer av markører som kan bli anvendt i foreliggende oppfinnelse innbefatter enzymer, radioisotoper, fluorescensforbindelser, kolloidal metaller, kjemo-luminescensforbindelser og bio-luminescensforbindelser. Fagfolk innenfor dette området kjenner til andre egnede markører for binding til anti-artrittogene peptidantistoffer ifølge oppfinnelsen, eller vil kunne oppnå slike ved anvendelse av rutinemessig eksperimentering. Binding av disse markørene til anti-artrittogene peptidantistoffer ifølge oppfinnelsen kan bli utført ved anvendelse av standardteknikker som er kjente for fagfolk innenfor dette området. En annen merkingsteknikk som kan resultere i høyere sensitivitet består av kobling av antistoffene til haptener med lav molekylvekt. Disse haptene kan deretter bli spesifikt detektert ved hjelp av en andre reaksjon. For eksempel er det vanlig å anvende haptener for dette formålet så som biotin, som reagerer med avidin.

For å differensiere mellom et individ hvor HLA-DW4 molekyler bærer RA mottakelighetssekvenspeptidet, men som til tross for dette ikke er predisponert for RA fra en som er genetisk disponert for RA, kan evnen som individet har til å produsere en humoral immunrespons overfor immunogenet dnaJ eller RA mottakelighetssekvenspeptidet også blitt testet. En lymfocytprøve blir inkubert med et immunogen artrittogen peptid. Et hvilket som helst anti-artrittogen peptid antistoff produsert i prøven blir deretter detektert i et hensiktsmessig immunanalyseformat som beskrevet ovenfor eller i eksempel V. For hensiktsmessig deteksjon kan det immunogene artrittogene proteinet eller peptidet bli merket i henhold til kjent teknikk.

25

C. REAGENSER FOR SOM SKAL ANVENDES I SCREENINGSMETODEN

Reagenser som anvendes i RA screeningsmetoden innbefatter artrittogene peptider, fortrinnsvis de som blir produsert syntetisk eller ved rekombinante midler. Rekombinante eller syntetiske dnaJ proteiner og artrittogene peptider vil være spesielt foretrukne reagenser som kan anvendes i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

1. Fremgangsmåter for produksjon av rensede, syntetiske og rekombinante artrittogene peptider

35

- Betegnelsen "vesentlig ren" som anvendt heri angir et protein som er vesentlig fri for andre forbindelser som det normalt kan være assosiert med in vivo. I foreliggende oppfinnelse refererer betegnelsen til homogene proteiner eller peptider inneholdende RA mottagelighetssekvens og homogenisiteten blir bestemt med referanse til
- 5 renhetsstandarder som er kjent for fagfolk innenfor dette området (renhet tilstrekkelig for å muliggjøre at den N-terminale aminosyresekvensen til proteinet blir oppnådd).

- Vesentlig rene artrittogene proteiner og peptider kan bli oppnådd fra intakte mikroorganismer (spesielt bakterier), gjennom mikrobiell ekspresjon, med syntese,
- 10 og/eller ved rensningsmetoder kjent for fagfolk innenfor dette området, så som affinitetskromatografi. Slike teknikker kan bli anvendt for å oppnå immunogene peptidfragmenter av dnaJ eller andre artrittogene proteiner.

- Nukleotider og aminosyresekvensene til flere bakterielle dnaJ proteiner er kjent. For eksempel er sekvensene for E. coli dnaJ rapportert i Albani et al., J. Clin. Invest., 89:327-331 (1992) (se også, SEQ ID NO: 1 heri) og sekvenser og Lactococcus lactis er rapportert i Van Asseldonk, et al., J. Bact., 175:1637-1644 (1993). Med referanse til slike sekvenser kan dnaJ proteinet og peptider spesielt bli syntetisert ved hjelp av slike vanlige anvendte metoder som t-BOC og Fmoc beskyttelse av alfa-amino grupper.
- 20 Begge metodene innbefatter trinnsvis syntese hvorved en enkel aminosyre blir tilsatt i hvert trinn begynnende fra den C-terminale enden av peptidet (se Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9). Peptider ifølge oppfinnelsen kan også bli syntetisert ved hjelp av forskjellige velkjente fast fase peptid syntese metoder, som de som er beskrevet av Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85:2149,
- 25 1962), og Stewart and Young (Solid Phase Peptides Synthesis, Freeman, San Francisco, 1969, s. 27-62), ved anvendelse av kopoly (styren-divinylbenzen) inneholdende 0,1-1,0 mmol aminer/g polymer. Ved endt kjemisk syntese kan peptidene bli avspaltet og spaltet fra polymeren ved behandling med flytende HF-10% anisol i omtrent 1/4-1 timer ved 0°C. Etter avdampning av reagensene blir peptidene ekstrahert fra polymeren med 1% eddiksyre oppløsning som deretter blir lyofilisert for å tilveiebringe råmaterialet. Dette kan normalt bli rensset ved slike teknikker som gelfiltrering på en "SEPHADEX □ G-15" eller "SEPHAROSE " affinitetskolonne ved anvendelse av 5% eddiksyre som et oppløsningsmiddel. Lyofilisering av hensiktsmessige fraksjoner fra kolonnen vil tilveiebringe det homogene peptidet eller peptidderivatene, som deretter kan bli
- 35 karakterisert ved slike standardteknikker som aminosyreanalyse, tynnsjikt-kromatografi, høy ytelse væske-kromatografi, ultrafiolett absorpsjonsspektroskopi, molar rotasjon, oppløselighet og sekvensert ved fast fase Edman degradering.

Oppfinnelsen tilveiebringer også polynukleotider som koder for artrittogene peptider med aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO: 5, og kan bli anvendt for å oppnå rekombinante, immunogene former av disse proteinene. Som anvendt heri refererer "polynukleotidet" til en polymer av deoksyribonukleotidet eller ribonukleotider, i form av et separat fragment eller som en komponent av en større konstruksjon. DNA kodende for et peptid ifølge oppfinnelsen kan bli oppstilt fra cDNA fragmenter eller fra oligonukleotider som tilveiebringer et syntetisk gen som har evne til å bli uttrykt i en rekombinant transkripsjonell enhet.

Som beskrevet i større detalj nedenfor kan polynukleotidsekvenser kodende for artrittogene proteiner bli uttrykt i enten prokaryoter eller eukaryoter. Verter kan innbefatte mikrobiell gjær, insekt og pattedyrorganismer. Fremgangsmåter for uttrykking av DNA sekvenser med eukaryote eller virale sekvenser i prokaryoter er velkjente innenfor fagområdet. Biologisk funksjonelle virale og plasmid DNA vektorer med evne til å uttrykke og replikere i en vert er kjent innenfor fagområdet. Slike vektorer (dvs. "rekombinante ekspresjonsvektorer") blir anvendt for å inkorporere DNA sekvensene ifølge oppfinnelsen. En illustrasjon av anvendelse av en ekspresjonsvektor for å uttrykke dnaJ er angitt i eksempel I. Disse sekvensene kan også bli innbefattet i "vertsceller", dvs. transformerte celler så som CHO og COS celler for anvendelse i genekspresjon.

DNA kodende for RA mottagelighetssekvens proteiner blir oppnådd fra kilder som er forskjellige fra E. coli. Bakterier ved a) oppnåelse av et cDNA bibliotek fra den bestemte organismen, b) utføre hybridiseringsanalyser med merket DNA kodende for E. coli. bakterielt artrittogent protein eller fragmenter derav (vanligvis større enn 100 bp) for å detektere kloner i cDNA biblioteket inneholdende homologe sekvenser, og c) analysering av klonene ved restriksjonsenzymanalyse og nukleinsyresekvensering for å identifisere full-lengde kloner. Dersom kloner med full lengde ikke er til stede i biblioteket kan hensiktsmessige fragmenter bli isolert fra de forskjellige klonene og ligert ved restriksjonssteder som er felles for klonene for å oppstille en full-lengde klon.

Prokaryoter blir anvendt for kloning av DNA sekvenser ved konstruering av dnaJ uttrykkende rekombinante ekspresjonsvektorer. For eksempel kan E. coli K12 stamme 294 (ATCC No. 31446) være spesielt nyttig. Prokaryoter blir også anvendt for ekspresjon. Den ovennevnte stammen, samt E. coli W3110 (ATCC No. 27325), bacilli så som Bacillus subtilis og andre enteribakteriaceae så som Salmonella typhimurium

eller *Serratia marcescans*, og forskjellige *pseudomonas* arter kan også bli anvendt for ekspresjon.

Generelt vil plasmid vektorer anvendt for å produsere rdna inneholde promotere og kontrollsekvenser som er avledet fra arter kompatible med vertscellen. Vektoren omfatter vanligvis et replikasjonssete samt markørsekvenser som har evne til å tilveiebringe fenotypisk seleksjon i transformerte celler. For eksempel blir *E. coli* vanligvis transformert ved anvendelse av pBR322, et plasmid avledet fra en *E. coli* art (Bolivar et al., *Gene*, 2:95, (1977)). pBR322 inneholder gener for ampicillin og tetracyklin resistens og tilveiebringer følgende enkle midler for identifisering av transformerte celler. pBR322 plasmidet, eller annet mikrobielt plasmid må også inneholde eller bli modifisert til å inneholde promotere og andre kontrollelementer som vanligvis blir anvendt i rekombinant DNA konstruksjon.

Promotere egnede for anvendelse med prokaryote verter innbefatter β -laktamase og laktose promoter systemer (Chang et al., *Nature*, 275:615, 1978; og Goeddel, et al., *Nature*, 281:544, 1979), alkalisk fosfatase, tryptofan (*trp*) promotersystem (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057, 1980) og hybride promotere så som *taq* promoteren (de Boer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25, 1983). Andre funksjonelle bakterielle promotere er egnede. Deres nukleotidsekvenser er generelt kjent innenfor fagområdet og muliggjør følgende fagfolk innenfor dette området til å ligere dem til DNA kodende for et RA mottagelighetssekvens protein (Siebenlist, et al., *Cell*, 20:269, 1980) ved anvendelse av linkere eller adaptere for å tilføre et hvilket som helst nødvendig restriksjonssete.

I tillegg til prokaryoter kan også eukaryote mikrober så som gjærkulturer bli anvendt. *Saccharomyces cerevisiae*, eller vanlig bakegjær, er den mest vanlige anvendte eukaryote mikroorganismen, til tross for at et antall andre stammer også er tilgjengelige.

Egnede promotersekvenser som kan anvendes med gjærverter innbefatter promotere for 3-fosfoglycerat kinase (Hitzeman, et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980) eller andre glykolytiske enzymer (Hess, et al. *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; og Holland, *Biochemistry*, 17:4900, 1978) så som enolase, gluyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfat isomerase, 3-fosfoglycerat mutase, pyruvat kinase, triosefosfat isomerase, fosfoglukose isomerase og glukokinase.

Andre gjærpromotere, som er induserbare promotere som har den ytterligere fordel med transkripsjonen kontrollert av vekstbetingelsene, er promoterregionene for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, degraderingsenzymer assosiert med nitrogen metabolisme, metallothionein, glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase og enzymer ansvarlige for maltose og galaktose anvendelsen. Gjærehancere blir også fortrinnsvis anvendt med gjærpromotere.

"Kontrollregion" refererer til spesifikke sekvenser ved 5' og 3' endene til eukaryote gener som kan bli involvert i kontroll av enten transkripsjon eller translasjon. Nesten alle eukaryote gener har en AT-rik region beliggende omtrent 25 til 30 baser oppstrøms fra setet hvor transkripsjonen blir initiert. En annen sekvens er tilstede 70 til 80 baser oppstrøms fra transkripsjonsstart til mange gener i CCAATX region hvor X kan være et hvilket som helst nukleotid. Ved 3' enden til de fleste eukaryote gener er det en AATAAA sekvens om kan være signal for addisjon av poly A halen til 3' enden av transkribert mRNA.

Foretrukne promotere som kontrollerer transkripsjonen fra vektorer i pattedyrvertsceller kan bli oppnådd fra forskjellige kilder, for eksempel, genomer til viruser så som polyoma, Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, hepatitt-B virus og fortrinnsvis cytomegalovirus, eller fra heterologe pattedyrpromotere, for eksempel beta aktin promoter. Tidlige og sene promotere til SV40 viruset blir oppnådd som et SV40 restriksjonsfragment som også inneholder SV40 viralt replikasjonsorigo (Fiers, et al, Nature 273:113, 1978). Øyeblikkelig tidlig promoteren til humant cytomegalovirus blir hensiktsmessig oppnådd som et HindIII E restriksjonsfragment (Greenaway, et al., Gene 18:355-360, 1982). Promotere fra vertscellen er relaterte arter er også nyttige heri.

Egnede vertsceller for transformasjon med og ekspresjon av vektorer ifølge denne oppfinnelsen kodende for artrittogene proteiner i høyere eukaryoter innbefatter: apenyre CV1 linje transformert av SV40 (COS-7, ATCC # 1651; human embryonisk nyrelinje (293, Graham, et al., J. Gen. Virol., 36:59, 1977); baby hamster nyre celler (BHK, ATCC CCL 10); kinesisk hamsterovarie-celler-DHFR (DHO, et al., Proc. Nat'l Sci. Acad. USA, 77:4216, 1980), muse sertoli celler (TM4, Mather, J.P., Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); ape nyreceller (CV1 ATCC #70); afrikansk grønn ape nyreceller (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma celler (HELA, ATCC #2); kanin nyreceller (MDCK, ATCC # 34); buffalo rotteleverceller (BRL 3A, ATCC # 1442); humane lunge celler (WI38, ATCC #75); humane leverceller (Hep G2, HB

8065); muse pattedyrtumor (MMT 060562, ATCC #51); og TRI celler (Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982).

"Transformasjon" betyr innføring av DNA inn i en organisme slik at DNA er replikerbar, enten som et ekstrakromosomalt element eller ved kromosomal integrasjon, som beskrevet i Graham et al., (Virology, 52:456-457, 1973). Andre metoder for innføring av DNA inn i celler så som ved nukleær injeksjon eller ved protoplastfusjon kan også bli anvendt. Dersom prokaryote celler eller celler som inneholder vesentlige celleveggkonstruksjoner blir anvendt kan transfeksjon bli oppnådd med midler som er velkjente innenfor fagområdet så som kalsiumbehandling ved anvendelse av kalsiumklorid som beskrevet av Cohen, F.N., et al., (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 69:2110, 1972).

"Transfeksjon" refererer til opptak av en ekspresjonsvektor i en vertscelle uansett om en kodende sekvens blir uttrykt. Flere metoder for transkripsjon er kjent for fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av for eksempel CaPO_4 eller elektroporasjon. Vellykket transfeksjon blir generelt oppdaget når indikasjonen på operasjon av transfektert vektor oppstår i vertscellen.

Konstruksjon av egnede vektorer inneholdende ønsket kodende og kontrollsekvenser anvender standard ligeringsteknikker. Isolerte plasmider eller DNA fragmenter blir spaltet, skreddersydd og religert ved anvendelse av standardteknikker i en form som er ønskelig for å danne de nødvendige plasmidene.

Vertsceller kan bli transformert med ekspresjonsvektorer ifølge oppfinnelsen og dyrket i konvensjonelt næringsmedium modifisert etter behov for indusering av promotere, selektering av transformanter eller amplifisering av gener. Dyrkningsbetingelser, så som temperatur, pH og lignende, er de som blir anvendt når vertscellen selektert for ekspresjon, og vil fremkomme for fagfolk innenfor dette området.

Polynukleotider som ikke koder for dnaJ protein, men som til tross for dette kan hybridisere med DNA kodende for et artrittogent protein kan også anvendes i oppfinnelsen (spesielt ved RÅ mottagelig sekvens) (for eksempel "primere" eller "prober"). Prober og primere vil generelt være oligonukleotider. "Oligonukleotider" refererer til enten et enkelttrådet polydeoksynukleotid eller to komplementære polydeoksynukleotidtråder som kan bli syntetisert kjemisk. Slike syntetiske oligonukleotider har ikke 5' fosfat og vil følgelig ikke ligere til et annet oligonukleotid

uten tilsetning av et fosfat med en ATP i nærvær av en kinase. Et syntetisk oligonukleotid vil bli ligert til et fragment som ikke er blitt defosforlyert. Slike oligonukleotider kan bli merket detekterbart med en detekterbar forbindelse så som en fluorescens gruppe, et radioaktivt atom eller en kjemiluminescensgruppe ved hjelp av kjente metoder og anvendt i konvensjonelle hybridiseringsanalyser.

Ovennevnte hybridiseringsteknikk kan bli tilpasset for å detektere om RA mottagelighetssekvensen er tilstede i et individs HLA molekyler. Slike analyser kan bli anvendt for å identifisere RA mottagelighetssekvensen i en analytisk prøve (for eksempel HLA molekyler), eller for in vitro diagnostisering så som deteksjon av DNA eller mRNA for RA mottagelighetssekvensen.

Sammensetninger som omfatter artrittogene proteiner kan innbefatte slike forbindelser som stabilisatorer og eksipienter beskrevet nedenfor, forutbestemte mengder av proteiner fra cellen eller organismen som virker som DNA kilder kodende for veksthormon reseptoren og bindingsproteinet, proteinet fra annet enn artrittogene proteinkilde organismer og syntetiske polypeptider så som poly-L-lysin. Rekombinante artrittogene proteiner og peptider som blir uttrykt i allogene verter vil selvfølgelig bli uttrykt fullstendig fri for genkildeproteiner. Ekspresjon av humane polynukleotider i kinesisk hamster ovarie (CHO) celler eller andre ikke-humane høyere pattedyrceller resulterer for eksempel i en sammensetning hvor proteinet ikke bare er fri for kontaminerende midler og humane proteiner.

2. Anti-artrittogent protein og anti-RA mottagelighetssekvens antistoffer.

Antistoffer som kan anvendes i denne fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan bli dannet mot intakte artrittogene proteiner, samt syntetiske eller rekombinante peptider. Slike peptider innbefatter og består fortrinnsvis av RA mottagelighetssekvensen (nedenfor "antistoffer ifølge oppfinnelsen"). Egnede immunogene, artrittogene peptider som kan anvendes i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er for eksempel beskrevet i sekvenslisten angitt heri som SEQ ID NO: 4 og 5. Aminosyrene etter RA mottagelighetssekvensen i SEQ ID NO: 4 og 5 er sannsynligvis ikke nødvendig for T-celle aktivering ved RA mottagelighetssekvensen, men forårsaker at peptidet er sterkt ladet og derfor, immunogent. Foretrukne immunogene, artrittogene peptider som kan anvendes for produksjon av antistoffer vil være minst omtrent 7-15 aminosyrer i total lengde.

Antistoffene vil fortrinnsvis bli dannet mot rekombinante artrittogene peptider for å forsikre at antisera er spesifikt for RA mottagelighetssekvensen og å muliggjøre produksjon av immunogene peptider i relativ stor skala. Antistoffene vil fortrinnsvis bli dannet i melk, så som bovin melk, for selektivt å stimulere produksjonen av IgG (som
 5 følgelig forsterker spesifisiteten til antisera for artrittogene peptider i stedet for andre GI bakterielle antigener).

Antistoffene vil også være nyttige for å detektere tilstedeværelse av RA mottagelighetssekvensen på HLA molekyler, i populasjoner av *E. coli* fra GI kanalen til
 10 et individ og i visse terapeutiske modaliteter beskrevet heri.

For å indusere en immunrespons overfor dnaJ eller et annet artrittogent protein eller peptid i et normalt dyr kan immunogenisiteten til proteinet eller peptidet bli forsterket ved kobling til et bærerprotein ved konjugasjon ved anvendelse av teknikker som er
 15 velkjente innenfor fagområdet. Slike vanlige anvendte materialer som er kjemisk koblet til molekylet for å forsterke deres immunogenisitet innbefatter keyhole limpet hemocyanin (KLH), tyroglobulin, bovin serum albumin (BSA) og tetanus toksoid. Det koblede molekylet blir deretter anvendt for å immunisere dyret (for eksempel en mus, kanin eller ku).

20 En multipl injeksjonsimmuniseringsprotokoll er foretrukket for anvendelse for immunisering av dyr med immunogent protein (se for eksempel Langone, et al., eds. "Production of Antisera with Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections", Methods of Enzymology, Acad. Press, 1981). En antistoff respons kan for
 25 eksempel bli oppnådd i kaniner ved intradermal injeksjon av 1 mg immunogent protein emulgert i fullstendig Freund's adjuvans etterfulgt flere uker senere av en eller flere boostere av samme antigen i ufullstendig Freund's adjuvans. En spesielt foretrukket fremgangsmåte for produksjon av terapeutiske antistoffer ifølge oppfinnelsen i kuer er beskrevet heri.

30 Polyklonale antistoffer produsert av immuniserte dyr kan videre bli rensset, for eksempel, ved binding til og eluering fra en matrise hvorpå proteinet eller peptidet som antistoffene er dannet mot er bundet til. Fagfolk innenfor dette området kjenner til forskjellige teknikker som er vanlige innenfor immunologiske områder for rensing
 35 og/eller konsentrering av polyklonale antistoffer, sant monoklonale antistoffer (se for eksempel Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Unit 9, (Wiley Interscience, 1991).

For fremstilling av monoklonale antistoffer er immunisering av mus eller rotter foretrukket. Betegnelsen "antistoff" som anvendt i foreliggende oppfinnelse skal også innbefatte intakte molekyler samt fragmenter derav, så som for eksempel, Fab og
5 F(ab')₂, som har evne til å binde et artrittogent protein eller peptid. Denne sammenheng refererer betegnelsen "mAb ifølge oppfinnelsen" til monoklonale antistoffer med spesifisitet for et artrittogent protein eller peptid.

Generell metode anvendt for produksjon av hybridomet som utskiller monoklonale
10 antistoffer ("mAb") er velkjente (Kohler and Milstein, Nature, 256:495, 1975). Som beskrevet av Kohler og Milstein omfatter teknikken isolering av lymfocytter fra regionale drenerende lymfeknuter til 5 separate cancerpasienter med enten melanoma, teratocarcinoma eller cancer i cervix, glioma eller lunge. Lymfocytene ble oppnådd fra kirurgiske prøver, slått sammen og deretter fusjonert med SHFP-1. Hybridomer ble
15 screenet for produksjon av antistoff som var bundet til cancercellelinjene. En ekvivalent teknikk kan bli anvendt for å produsere og identifisere mAb med spesifisitet for et artrittogent protein.

Bekreftelse på artrittogent protein spesifisitet blant mAb kan bli oppnådd ved
20 anvendelse av relativt rutinemessige screeningsteknikker (så som enzymkoblet immunosorbent analyse, eller "ELISA") for å bestemme det elementære reaksjonsmønsteret til mAb av interesse.

Det er også mulig å vurdere et mAb for å bestemme om det har samme spesifisitet som
25 mAb uten unødig eksperimentering ved å bestemme om mAb som blir testet forhindrer et mAb fra å bli bundet til et RA artrittogent protein. Dersom mAb som blir testet konkurrerer med mAb, som vist ved en reduksjon i binding av mAb, er det sannsynlig at to monoklonale antistoffer blir bundet til samme eller nært beslektet epitope.

30 En annen måte for å undersøke om et mAb har spesifisiteten til et mAb er å pre-inkubere mAb med et antigen som det er normalt reaktivt med, og bestemme om mAb som blir testet blir inhibert i dets evne til å binde antigenet. Dersom mAb som blir testet er inhibert er det sannsynlig at det binder den samme epitopen som et mAb.

III. TERAPEUTISKE FREMGANGSMÅTER

A. Passiv antistoff terapi.

- 5 Som angitt andre steder ovenfor, er det antatt at minst de tidlige stadier av RA avhenger av kontinuerlig belastning av sirkulerende monocytter med IgG immunkomplekser inneholdende artrittogene proteiner og peptider så som dnaJ. Denne "belastningen" er muliggjort i det minste delvis av svikten til GI immunsystemet for å produsere tilstrekkelige antistoffer, spesielt IgA, for å forhindre fjerning av artrittogent protein, 10 peptider og/eller beslektede antigener i sirkulasjon.

En terapeutisk fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen er derfor rettet mot innføring av antistoffer inn i et individ med tidlig stadium av RA eller som er predisponert for sykdom. Disse antistoffene kan bli produsert som beskrevet ovenfor og vil, i det tilfellet, 15 fortrinnsvis være monoklonale antistoffer og vil bli administrert enteralt, fortrinnsvis i enterale belagte tablettformer. Antistoffene vil alternativt bli produsert i melk som beskrevet nedenfor.

Antistoffene som blir anvendt vil være spesifikke for dnaJ protein eller annet 20 artrittogent protein (nedenfor, "terapeutiske antistoffer"). Antistoffene kan bli dannet ved immunisering av et dyr med disse antigenene i nativ, syntetisk eller rekombinant form. Antigenene som blir anvendt kan bli avledet fra en hvilke som helst organisme som uttrykker RA mottagelighetssekvensen, men vil fortrinnsvis bli dannet mot mikroorganismer som er i tarmen og som uttrykker peptidet som del av et 25 varmesjokkprotein. Det er mest foretrukket at antigenene vil bli avledet fra *E. coli* (på grunn av tilstedeværelse av denne arten i human GI kanal), men kan også bli dannet mot en cocktail av antigener fra forskjellige mikrobielle arter for å forsikre at antistoffene vil være spesifikke for artrittogene proteiner og peptider fra et bredt spekter av organismer.

30 For å utvikle antistoffer i melk (som deretter kan bli administrert terapeutisk som "immun melk"), blir diende dyr, fortrinnsvis kuer, immunisert med immunogent RA mottagelighetssekvenspeptid som generelt beskrevet ovenfor. Kumelk er foretrukket medium for produksjon av anti-RA mottagelighetssekvens peptidantistoffer på grunn av dets absorberbarhet inn i den humane GI kanalen. Melk kan bli oppsamlet, pasteurisert og fortrinnsvis lyofilisert for lagring ved konvensjonelle teknikker og anvendt som et 35 tørrmelk pulver. Immunmelkepulveret kan bli administrert i pulver eller rekonstituert form ved indre veier generelt som beskrevet i US-PS 4.732.737, og beskrivelsen derav

er innkorporert heri som referanse (fra kolonne 8, linje 5 til og med kolonne 14, linje 11).

5 B. Antibiotisk eliminering og repopulasjon av mage-tarm bakterier

Til tross for at proteiner ikke normalt effektivt krysser tarmbarrieren i mennesker ser det ut som om, basert på observasjoner diskutert ovenfor at artrittogene antigener (for eksempel dnaJ) kommer i kontakt med det systemiske immunsystemet til personer med RA. Denne utførelsesformen er derfor rettet mot forhindring eller minimalisering av kontakt mellom det systemiske immunsystemet og artrittogene antigener ved eliminering av sistnevnte kilde. Ifølge denne fremgangsmåten kan GI tarmbakterier som uttrykker RA mottagelighetssekvensen som del av et varmesjokkprotein bli erstattet med ellers identiske bakterier som ikke har evne til å uttrykke RA mottagelighetssekvensen (dvs. "RA benigne bakterier", som kan enten inneholde en "RA benign mottagelighetssekvens", eller kan være fri for RA mottagelighetssekvens).

RA benigne bakterier vil bli dannet ved setespesifikk mutagenese av RA mottagelighetssekvensen. Sammenligninger av aminosyresekvensen i dnaJ proteiner fra forskjellige mikrobielle arter tyder sterkt på at den RA mottagelige sekvensen ikke er essensiell for den biologiske aktiviteten til proteinet (se for eksempel Silver, et al., Cell, 74: 5-6 (1993)). Modifikasjon av RA mottagelighetssekvensen i en organisme som gjør ekspresjonsproduktet benignt reduserer ikke evnen som organismen har til å overleve i human GI kanal.

En modifikasjon av RA mottagelighetssekvensen fra OKRAA til DERAA reduserer evnen som modifisert artrittogent protein har til å stimulere lymfocytter fra individer med tidlig stadium av RA (se eksempel III og figur 2). Modifikasjon av RA mottagelighetssekvensen fra QK/RRAA til DERRAA eller en tilsvarende variant vil være en foretrukket modifikasjon som vil danne RA benigne bakterier.

Andre mindre modifikasjoner i primær aminosyresekvens til dnaJ, eller til andre artrittogene proteiner, kan resultere i varianter som er RA benigne, men som ellers har vesentlig ekvivalent aktivitet overfor villtype proteinet. Alle variantene produsert i disse modifikasjonene er innbefattet heri dersom den resulterende, modifiserte mikroorganismen er RA benign og den biologiske aktiviteten til stede i det opprinnelige proteinet fortsatt eksisterer.

Aminosyresekvensvarianter faller inn under en eller flere av følgende tre klasser; substitusjonelle, innskudds- eller delesjonsvarianter. Variantene blir dannet ved setespesifikk mutagenese av nukleotidene i DNA kodende for villtype protein og produserer derved DNA kodende for varianten, og uttrykker deretter DNA i rekombinant cellekultur. Peptider med opp til omtrent 100-150 residier kan bli hensiktsmessig dannet ved in vitro syntese.

I det sete for innføring av en aminosyresekvens variasjon er forutbestemt trenger mutasjonen i seg selv ikke være forutbestemt. For å optimalisere ytelsen til en mutasjon ved et gitt sete kan tilfeldig mutagenese bli rettet mot målkodonet eller regionen og uttrykte RA benigne mottagelighetssekvenspeptidvarianter screenet for optimale kombinasjon av ønsket aktivitet. Teknikker for å danne substitusjonsmutasjoner ved forutbestemte seter i DNA som har en kjent sekvens er velkjent, for eksempel M13 primer mutagenese. Aminosyresubstitusjoner har vanligvis enkeltresidier og innskudd vil vanligvis være i størrelsesorden fra 1 til 10 aminosyreresidier; og delesjoner vil variere omtrent fra 1 til 30 residier. Delesjoner eller innskudd blir fortrinnsvis dannet i ved siden av liggende par, dvs. en delesjon av to residier eller innskudd av to residier.

I tillegg til å gjøre den RA mottagelighetssekvensen RA benign kan modifikasjoner bli dannet for å øke eller redusere stabiliteten til proteinet, for å ødelegge dets ekspresjon (for eksempel ved å ødelegge en promotor som normalt vil diktere ekspresjonen av RA mottagelighetssekvensen), eller oppnå andre ønskelige modifikasjoner i proteinet, i det modifikasjonene vil være innlysende for fagfolk innenfor dette området. For eksempel kan delesjon eller substitusjon av potensielle proteolyseseter også bli oppnådd ved deletering av slike residier eller substituering av et glutaminyl eller histidylresidie. Slike modifikasjoner i intakte bakterier kan bli oppnådd ved konvensjonell rekombinant DNA teknologi, inkludert teknikker beskrevet i del II, C ovenfor.

RA benigne bakterier vil fortrinnsvis være resistente overfor antibiotika. Frem til nå vil et polynukleotid som utviser slik antibiotikaresistens bli innbefattet i genomet til RA benigne bakterier, så som gener som utviser ampicillin og tetracyklin resistens som er velkjent innenfor fagområdet (se for eksempel Bolivar, et al., Gene, 2:95 (1977)). Det er mest foretrukket at RA benigne bakterier også vil bli gjort vesentlig fri for lipopolysakkarid ("LPS") ved hjelp av velkjente metoder innenfor fagområdet (se for eksempel J. Immun. Methods. 132: 191-195, 1990).

RA benigne bakterier ifølge oppfinnelsen vil bli anvendt for å repopulere en human GI kanal hvor den endogene bakterielle populasjonen (hovedsakelig E. coli) er blitt tappet. Denne tappingen kan bli oppnådd ved intensiv antibiotika terapi oppnådd med fremgangsmåter og reagenser som er velkjente for fagfolk innenfor kliniske områder. Et
 5 spesielt effektivt terapeutisk regime som kan anvendes i dette henseendet vil innbefatte administrering av et ikke-absorberbart antibiotikum, fortrinnsvis et bredspektret antibiotika, (så som neomycin eller kanamycin) i terapeutiske effektive doseringer ved enterale veier til et individ med tidlig stadium av RA eller som er predisponert for sykdommen i en periode på 1 til 8 uker eller lengre. I denne sammenhengen vil en
 10 "terapeutisk effektiv dosering" av antibiotika være en dosering som er tilstrekkelig for å vesentlig eliminere den endogene bakterielle populasjonen fra GI kanalen til pasienten. Slike doseringer vil variere avhengig av antibiotika som blir administrert. Egnede doseringer er kjent for leger innenfor dette området. Graden hvorved RA benigne bakterier vil bli administrert vil avhenge av alder, vekt og tilstanden til pasienten samt i
 15 hvilken grad den endogene bakterielle populasjonen som de vil erstatte blir tappet. I en terapeutisk dosering av RA benigne bakterier er generelt 10^6 til 10^8 bakterie/dose.

For å minimalisere negative reaksjoner i pasienten fra tapping av endogen bakteriell populasjon i pasientens GI kanal i løpet av antibiotikaterapien, kan antibiotika bli
 20 administrert under vesentlig sterile tilstander i sykehus eller med hensiktsmessige begrensninger på pasientens aktiviteter og diett. Alternativt eller samtidig vil en mer praktisk terapeutisk metode være innføring av antibiotikaresistente RA benigne bakterier til pasientens GI kanal i løpet av antibiotika terapien for å erstatte den antibiotika tappede populasjonen av villtype bakterier.

25

C. AKTIV IMMUNISERING MED ET RA MOTTAGELIGHETSSEKVENST PROTEIN

Ovennevnte metoder kan bli supplementert med en aktiv immuniseringsprotokoll
 30 hvorved pasienten blir immunisert med et immunogent RA mottagelighetssekvensprotein eller peptid. For å forsikre renhet og reproducerbarhet til det immuniserende peptidet vil det fortrinnsvis bli produsert og anvendt i rekombinant form.

35 Rekombinante artrittogene proteiner kan bli produsert som beskrevet ovenfor og som illustrert i eksempel I nedenfor. Immunogene former av disse proteinene og konjugater derav kan bli produsert som beskrevet ovenfor og anvendt som en vaksine ("RA

vaksine") generelt som beskrevet med hensyn på syntetisk RA mottagelighetssekvens
vaksiner i PCT publisert patentsøknad no. WO 9014835, "Method to Treat Rheumatoid
Arthritis", Carson, et al., oppfinnere (inngitt 5/31/90), og beskrivelsen er inkorporert
heri som referanse som en illustrasjon på en egnet immuniseringsprotokoll som kan
5 anvendes.

De immunogene peptidene ifølge oppfinnelsen vil fortrinnsvis bli administrert som en
RA vaksine på en måte som er tilstrekkelig for selektivt å stimulere IgA produksjon i
pasientens GI kanal. De immunogene peptidene ifølge oppfinnelsen vil fortrinnsvis bli
10 administrert samtidig med et immunstimulerende middel som er kjent innenfor
fagområdet for å indusere IgM omdanning til IgA; for eksempel TGF- β , som også
inhiberer systemisk helper T celle aktivitet. Det immunogene peptid/IgA
immunstimulerende middelet ifølge oppfinnelsen vil fortrinnsvis bli administrert
enteralt for å lokalisere effekten av vaksinen i GI kanalen.

15 Avhengig av pasientens tilstand kan det også være ønskelig å administrere
immunstimulerende midler og/eller immun undertrykkende midler hvor virkningen vil
være rettet mot pasientens systemiske immunsystem. Egnede forbindelser som har
denne aktiviteten er velkjent innenfor fagområdet og innbefatter interleukin-6 (for
20 stimulering av suppressor/cytotoksiske T celler) samt syklosporin A og anti-CD4
antistoffer (for immunsuppressjon). Disse forbindelsene kan bli administrert ifølge
legens vurderinger for fortrinnsvis å utvide suppressor/cytotoksisk T
lymfocyttopulasjon til en pasient hvor det systemiske immunsystemet antas å være,
eller er kjent for å være eksponert for et artrittogent antigen.

25 RA vaksinene ifølge oppfinnelsen kan bli dannet for administrering ved blanding av de
aktive komponentene til vaksinen med fysiologiske akseptable bærere. Slike bærere vil
være ikke-toksiske for mottageren ved doseringene og konsentrasjonene som blir
anvendt. Preparering av slike sammensetninger omfatter vanligvis kombinerende av det
30 bestemte proteinet med buffere, antioksideringsmidler så som askorbinsyre, lav
molekylvekt (mindre enn 10 residier) polypeptider, proteiner, aminosyrer, karbohydrater
inkludert glukose eller dekstriner, gelateringsmidler så som EDTA, glutation og andre
stabiliseringsmidler og eksipienter. Slike sammensetninger kan være i suspensjon,
emulsjon eller lyofilisert form og vil være farmasøytisk akseptabel, dvs. dannet på egnet
35 måte og godkjent for anvendelse i den ønskede applikasjonen.

Med hensyn på sammensetninger inneholdende TGF- β blir molekyler fra TGF- β familien vanligvis produsert i form av inerte forløpere som blir aktivert ved eksponering for syre eller proteaser. Fagfolk innenfor dette området vil derfor kunne selektere bærere og/eller eksipienter som kan anvendes i RA vaksine sammensetninger ifølge oppfinnelsen som verken vil interferere med in vivo aktivering av TGF- β komponenten eller aktivere komponenten prematurt (dvs. før administrering av sammensetningen).

Protokoll for administrering av RA vaksiner ifølge oppfinnelsen vil variere med deres sammensetning samt alder, vekt og tilstand til pasienten. En foretrukket protokoll for administrering av RA vaksinene vil innbefatte daglig oral (enteral) administrering av immunologiske effektive doseringer av vaksinen, med eller uten andre former for terapi, så som fremgangsmåtene beskrevet ovenfor og konvensjonelle anti-inflammatoriske behandlinger (for eksempel anvendelse av steroidale eller ikke-steroidale anti-inflammatoriske medikamenter og/eller smertestillende midler).

Avhengig av doseringsfrekvensen, vil en immunologisk effektiv dosering variere fra 100 μ g - 100 mg (fortrinnsvis 1-100 mg) immunogent protein eller peptid. Daglige doseringer av det immunogene peptidet vil fortrinnsvis bli gitt i mengder på omtrent 1 mg/dag. Konvensjonelle doseringer til en immunstimulerende/immunsupprimerende komponent i RA vaksinen vil bli anvendt (for eksempel 1-100 μ g/kg interleukin-6). Slike doseringer vil være kjent for, eller kan lett bli bestemt av, fagfolk innenfor dette området. Behandling i RA pasienter i tidlig tilstand kan bli fortsatt etter observasjon av surrogat sluttpunktet for RA beskrevet videre nedenfor.

Vaksinering av pasienter som er predisponert for RA, men som ikke har utviklet sykdommen, kan bli oppnådd ved korttids administrering av en eller flere doseringer av RA vaksinene ifølge oppfinnelsen som er tilstrekkelig for å produsere detekterbare økninger i anti-immunogent peptid IgA i fluider til pasientens GI kanal. Foretrukket anvendelse av RA vaksiner ifølge oppfinnelsen vil være i pasienter med tidlig stadium av RA.

D. INDISIER PÅ TERAPEUTISK EFFEKTIVITET

Effektiviteten til terapeutiske metoder over tid kan bli vurdert ved fravær av kliniske tegn på RA i pasienter som er predisponerte for sykdommen (men som ikke har utviklet denne). I pasienter som er blitt diagnostisert å ha RA vil effektiviteten til

fremgangsmåten måles ved å redusere alvorligheten til symptomene til pasienten eller ved tilstedeværelse av et surrogat slutt punkt for sykdommen.

Konvensjonelle parametere for kliniske symptomer på RA og surrogat slutt punkter for sykdommen er velkjente for fagfolk innenfor dette området og innbefatter "Ritchie Index" measurements for joint tenderness (Ritchie, et al., Q.J. Med. 37: 393-406 (1968)), antall ledd som er oppsvulmede, daglig varighet av morgenstivhet i ledd, gripstyrke, smerteintensiteten på en visuell analog skala (Huskisson, Lancet, 2:1127-1131 (1974)), og relative nivåer for anvendelse av anti-inflammatoriske midler og/eller smertestillende midler til pasienten.

Basert på resultatene til dobbeltblind kliniske forsøk til et E. coli ekstrakt, Brackertz, et al., J. Rheum. (16:19-23 (1989)) vil fagfolk innenfor dette området vente at den kliniske toleransen til RA vaksinen og antistoff sammensetningene ifølge oppfinnelsen er god. Alvorligheten til viktigste bivirkninger (så som mage-tarm irritasjon) er ventet å være lav. Toksisiteten til disse sammensetningene kan bli registrert ved konvensjonelle metoder, så som periodiske laboratorievurderinger gjennom analyser av slike variable som hematokrit, hemoglobin, trombocyt og reumatoide faktornivåer samt blodkjemi. Oppfinnelsen er nå blitt fullstendig beskrevet og illustrert ved eksemplene nedenfor.

Eksempel I

Kloning, ekspresjon og rensing av E. coli

Et 1,1-kb DNA fragment inneholdende E. coli dnaJ gen (se SEQ ID NO: 1) ble amplifisert ved polymerasekjedereaksjon fra en rekombinant fag som omfatter dnaK og dnaJ genene til E. coli. Polymerase kjedereaksjonsproduktet ble subklonet i XbaI setet til vektoren PCG808fX (New England Biolabs, Beverly, MA) og uttrykt som et maltose bindende fusjonsprotein som ble rensset ved filtrering på en hvilken som helst amylose kolonne og eluering i en amylosebuffer. Et kanin antiserum til fusjonsproteinet ble anvendt for å rense rdnaJ uttrykt ved kloning i XbaI setet til en pUC19 vektor. Frem til nå ble kanin IgG rensset på immobilisert protein A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) og koblet til en agarose bærer matrise (AFFI-GEL Hz, et varemerkeprodukt til Bio-Rad Laboratories, Richmond CA). rdnaJ ble deretter oppnådd ved å kjøre rå cellulære ekstrakter gjennom affinitetskolonnen og eluering av bundet protein i glycinbuffer, pH 2,5. Polyakrylamid gelelektroforese av rensset produkt viste et unikt bånd med ventet molekylvekt på 41 kD.

Eksempel II**Responsen til lymfocytter fra pasienten med tidlig stadium****av RA til rdnaJ**

Lymfocytter fra pasienter med tidlig ubehandlet reumatoid artritt (RA) ble oppnådd fra blodet (perifere blodlymfocytter, eller "PBL") fra synovial fluidene ved anvendelse av standard aseptiske teknikker. Cellene ble inkubert i 7 dager med rensset rekombinant E. coli dnaJ (10 µg/ml, oppnådd som beskrevet i eksempel I) i RPMI 1640 medium supplementert med 10% forscreenet human AB type serum. Lymfocytter fra de kontrollindivider (dvs. personer uten RA) ble likeledes behandlet. Proliferasjon i løpet av de siste 16 dyrkningstimene ble uttrykt som en stimuleringsindeks

$$= \text{cpm i kulturer med dnaJ}$$

$$\text{cpm i kulturer uten dnaJ.}$$

Basert på cellulære proliferasjonsresponser av PBL fra 14 tidlig stadium RA pasienter, og av synovial fluidlymfocytter fra 8 tidlig stadium RA, var proliferasjonsresponsene til PBL omtrent 3,6 ganger høyere enn responsen til kontrollindividlymfocytter, mens responsen til synovial fluid lymfocytene var omtrent 2,3 ganger høyere enn responsen til kontrollindivid lymfocytter (se, fig. 1).

Eksempel III**Respons til lymfocytter fra pasienter med tidlig stadium****RA overfor RA mottagelighetssekvenspeptider**

Lymfocytter fra pasienter med tidlig stadium RA ble kontaktet med en av to RA mottagelighetssekvenspeptider ifølge protokollen beskrevet i eksempel II. Peptidene som ble anvendt var enten et 15 aminosyresyntetisk peptid med villtype sekvens QKRAAYDQYGHAAFE eller et 15 aminosyresyntetisk mutantpeptid som har sekvensen DERAAYDQYGHAAFE.

Som vist i figur 2 med resultater ifølge samme standard på målingen anvendt for eksempel II, var responsene til PBL overfor villtype peptidet mer enn 5 ganger høyere enn responsene til PBL overfor mutantpeptid og omtrent 9 ganger høyere enn responsen til lymfocytene fra kontrollindivider overfor villtype peptid.

Eksempel IV

Inhibisjon av antistoffbindingen til dnaJ

Mikrotiterskåler ble belagt med rekombinant dnaJ (10 µg/ml). Enten sera oppnådd fra pasienter med tidlig stadium RA eller sera fra kontrollindivider ble fortynnet 1:100 i boratbufret saltvann. Halvparten av hver prøve ble inkubert over natt ved 4°C med villtype dnaJ peptid beskrevet i eksempel III. Deretter ble parede serumprøver tilsatt til dnaJ belagte skåler.

Etter 4 timers inkubasjon ble antistoff binding detektert med alkalisk fosfatase merket geit anti-humant IgG; nivåer av detektert antistoffbinding ble bestemt ifølge følgende formel:

$$\% \text{ inhibisjon} = 100 \frac{(1 - \text{OD}_{460} \text{ med villtype peptid})}{(\text{OD}_{460} \text{ uten villtype peptid})}$$

Som vist i figur 3 ble antistoffbinding til rdnaJ også inhibert, av villtype RA mottakeligetssekvenspeptidet, i omtrent 3 ganger høyere grad i RA sera enn inhibisjon detektert i kontrollsera.

Eksempel V

Bestemmelse av genetisk predisposisjon

overfor RA ved immunanalyse

Antistoffresponser overfor rdnaJ ble målt ved ELISA. 100 µl alikvoter av rdnaJ (10 µg/ml) eller membranproteiner fra HLA DR eller DR41 homozygote celler (100 µg/ml) ble anvendt for å belegge ELISA skåler ved 4°C over natten. Deretter ble forskjellige fortynninger av kaninsera tilsatt i en 2 timers inkubasjon ved romtemperatur. Etter vasking med BBS/0,2% Tween-20, ble bundet antistoff detektert ved anvendelse av alkalisk fosfatase-konjugert geite anti-kanin IgG (Boehringer-Mannheim Biochemicals) fortynnet 1:1000. Resultatene er uttrykt i figur 5 som gjennomsnittlig OD ved 405 nm til duplikate brønner.

OPPSUMMERING AV SEKVENSENE

SEQ ID NO: 1 er den åpne leserammen til polynukleotidet kodende for E. coli K12 dnaJ.

5

SEQ ID NO: 2 er aminosyresekvensen til en RA mottagelighetssekvens variant.

SEQ ID NO: 3 er aminosyresekvensen til en RA mottagelighetssekvens variant.

10

SEQ ID NO: 4 er aminosyresekvensen til et immunogent dnaJ peptid.

SEQ ID NO: 5 er aminosyresekvensen til et immunogent dnaJ peptid.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5

(i) APPLICANT: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA

(ii) TITLE OF INVENTION: METHOD AND REAGENTS FOR THE TREATMENT OF
RHEUMATOID ARTHRITIS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

10

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: ROBBINS, BERLINER & CARSON
(B) STREET: 201 N. FIGUEROA STREET, 5TH FLOOR
(C) CITY: LOS ANGELES
(D) STATE: CALIFORNIA
(E) COUNTRY: US
(F) ZIP: 90012

15

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

20

(vii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: BERLINER, ROBERT
(B) REGISTRATION NUMBER: 20,121
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 5555-314

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 213-977-1001
(B) TELEFAX: 213-977-1003

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1:

25

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 1055 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (klonal)

(vii) ØYEBLIKKELIG KILDE:

(B) KLON: E. coli K12 dnaJ polynukleotid (cDNA)

35

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: CDS
(B) BELIGGENHET: 1..1054

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE SEQ ID NO: 1:

	ATGGCTAAGC AAGATTATTA CGAGATTTTA GCGGTTTCCA AAACAGCGGA AGAGCGTGAA	60
	ATCAGAAAGG CCTACAAAGC CCGGCCATG AAATACCACC CGGACCGTAA CCAGGGTGAC	120
	AAAGAGGECT ATGGTCATGC TGCCTTTGAG CAAGGTGGCA TGGCGGCGG CGGTTTTGGC	180
5	GGCGGCGCAG ACTTCAGCGA TATTTTTGGT GACGTTTTCG GCGATATTTT TGGCGGCGGA	240
	CGTGGTCGTC AACGTCCGGC GCGCGGTGCT GATTACGCT ATAACATGGA GCTCACCTC	300
	GAAGAAGCTG TACGTGGCGT GACCAAAGAG ATCCGCATTC CGACTCTGGA AGAGTGTGAC	360
	GTTTGCCACG GTAGCGGTGC AAAACCAGGT ACACAGCCGC AGACTTGTCC GACCTGTCAT	420
10	GGTTCTGGTC AGGTGCAGAG GCGCCAGGGA TTCTTCGCTG RACAGCAGAC CTGTCAACAC	480
	TGTCAGGGCC GCGGTACGCT GATCAAGAT CCGTGAACA AATGTCATGG TCATGGTCGT	540
	CTTGAGCGCA GCAAAACGCT TCCGTTAAAA TCCCGGCAGG GGTGGACACT GGACACCGCA	600
	TCCGCTCTGC GGGCGAAGGT GAAGCGGGCG AGCATGGCGC ACCGGCAGGC GATCTGTACG	660
15	TTCAGGTTCA GGTAAACAG CACCCGATTT TCGAGCGTGA AGGCAACAAC CTGTATTGCG	720
	AAGTCCCGAT CAACTTCGCT ATGGCGGCGC TGGGTGGCGA AATCBAAGTA CCGACCCCTG	780
	ATGGTCGCGT CAAACTGAAA GTGCCTGGCG AAACCCAGAC CGGTAAGETA TTCCGTATGC	840
	GCGGTAAAGG CGTCAAGTCT GTCCGCGGTG GCGCACAGGG TGATTTGCTG TGCCGCGTTG	900
20	TCGTGGAAC ACCGGTAGGC CTGAACGAAA GGCAGAAACA GCTGCTGCAA GAGGTGCAAG	960
	AAAGATTCGG TGGCCCAACC GGCAGACACA ACAGCCCGCG CTCAAAGAGC TTCTTTGATG	1020
	GTGTGAAGAA GTTTTTTGAC GACCTGACCC GCTAA	1055

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

- 25 (A) LENGDE: 5 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (C) TRÅDTYPE: enkel
 (D) TOPOLOGI: lineær

30 (ii) MOLEKYLTYP: peptid

(B) KLON: RA mottagelighetssekvensvariant

(ix) TREKK:

- 35 (A) NAVN/NØKKEL: peptid
 (B) BELIGGENHET: 1..5

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE SEQ ID NO: 2:

Gln Lys Arg Arg Ala

40 1

5

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 5 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

5 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA peptid

10 (vii) ØYEBLIKKELIG KILDE:

(B) KLON: mottagelighetssekvens variant

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: peptid

15 (B) BELIGGENHET: 1..5

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE SEQ ID NO: 3:

Gln Arg Arg Ala Ala

20 1 5

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

25 (A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

30 (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(vii) ØYEBLIKKELIG KILDE:

(B) KLON: Immunogent dnaJ peptid

35 (ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: peptid

(B) BELIGGENHET: 1..15

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE SEQ ID NO: 4:

Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu
 1 5 10 15

5

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

10

(B) TYPE: aminosyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

15

(vii) ØYEBLIKKELIG KILDE:

(B) KLON: Immunogent dnaJ peptid

(ix) TREKK:

20

(A) NAVN/NØKKEL: peptid

(B) BELIGGENHET: 1..15

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE SEQ ID NO: 5:

Asp Glu Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu
 25 1 5 10 15

30

Patentkrav

1.
Isolert polynukleotid, k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et peptid bestående av
5 en aminosyresekvens utvalgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO:
5.
2.
Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et polynukleotid ifølge krav
10 1 og en fysiologisk akseptabel bærer.
3.
Isolert artrittogent peptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at peptidet har en
aminosyresekvens ifølge bestående av SEQ ID NO: 4 eller SEQ ID NO: 5.
15
- 4,
Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et artrittogent peptid ifølge
krav 3 og en fysiologisk akseptabel bærer.
- 20 5.
Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et artrittogent peptid ifølge
krav 3, der sammensetningen er en vaksinesammensetning.
6.
25 Vaksinesammensetning ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer.
7.
Genekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et polynukleotid
30 ifølge krav 1 operasjonelt bundet til en kontrollsekvens.
8.
Vektor ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at kontrollsekvensen er en promoter.
- 35 9.
Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en vektor ifølge krav 7.

10.

Sammensetning ifølge krav 2, 4, eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter en immunmodulerende forbindelse.

5 11.

Sammensetning ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at den immunmodulerende forbindelse i sammensetningen er transformerende vekstfaktor- β (TGF- β).

12.

10 Anvendelse av et polynukleotid ifølge krav 1 for fremstilling av et medikament for å behandle eller forebygge reumatoid artritt hos et individ.

13.

15 Anvendelse av et peptid ifølge krav 3 for fremstilling av et medikament for å behandle eller forebygge reumatoid artritt hos et individ.

14.

Anvendelse av en sammensetning ifølge krav 2 eller 4 for fremstilling av et medikament for å behandle eller forebygge reumatoid artritt hos et individ.

20

15.

Anvendelse ifølge krav 12, 13 eller 14 der medikamentet formuleres for administrering via en administrasjonsmåte utvalgt fra gruppen bestående av intramuskulær injeksjon, intravaskulær injeksjon, absorpsjon, intradermal, transdermal, mukosal, enteral og oral administrering.

25

1/2

FIG. 1

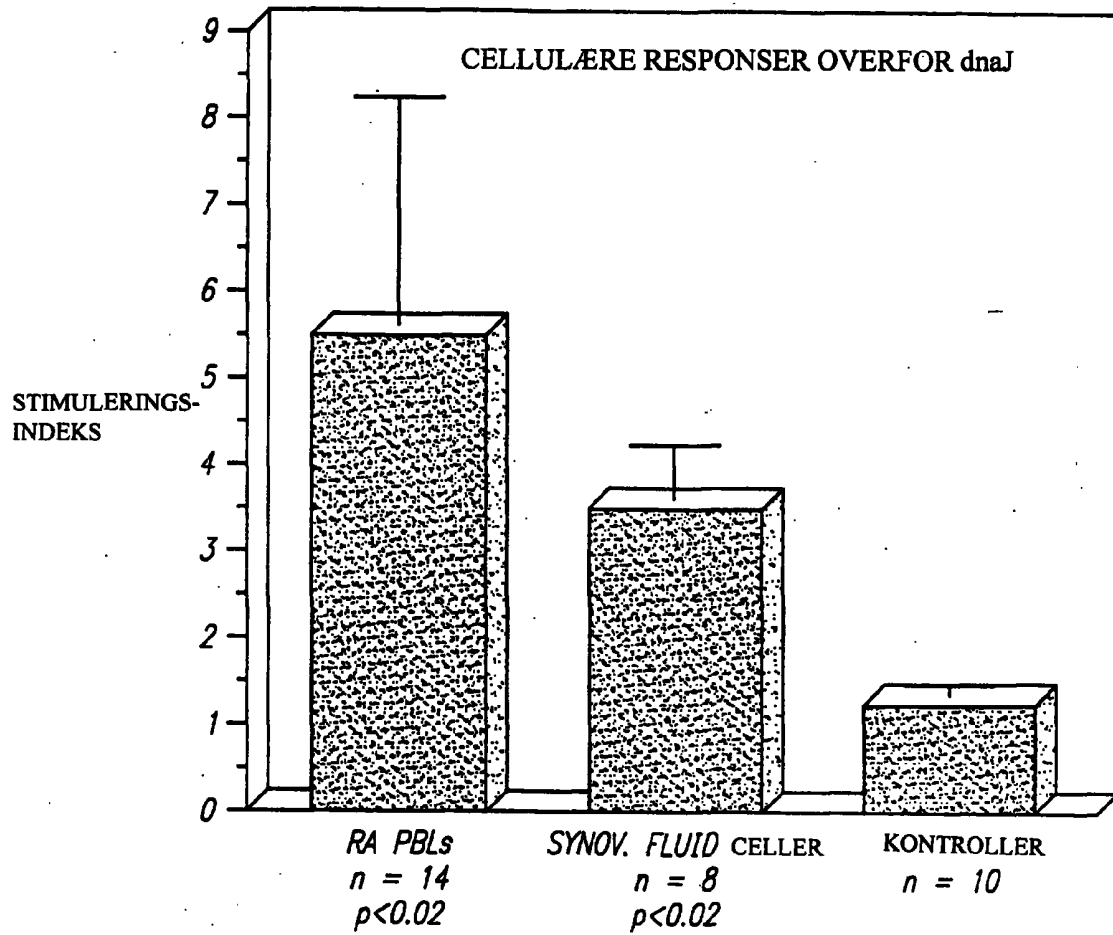


FIG. 4

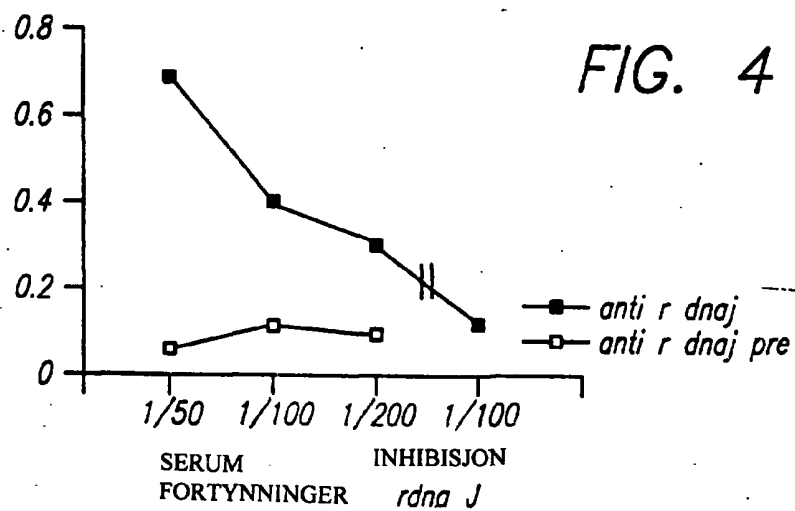


FIG. 2

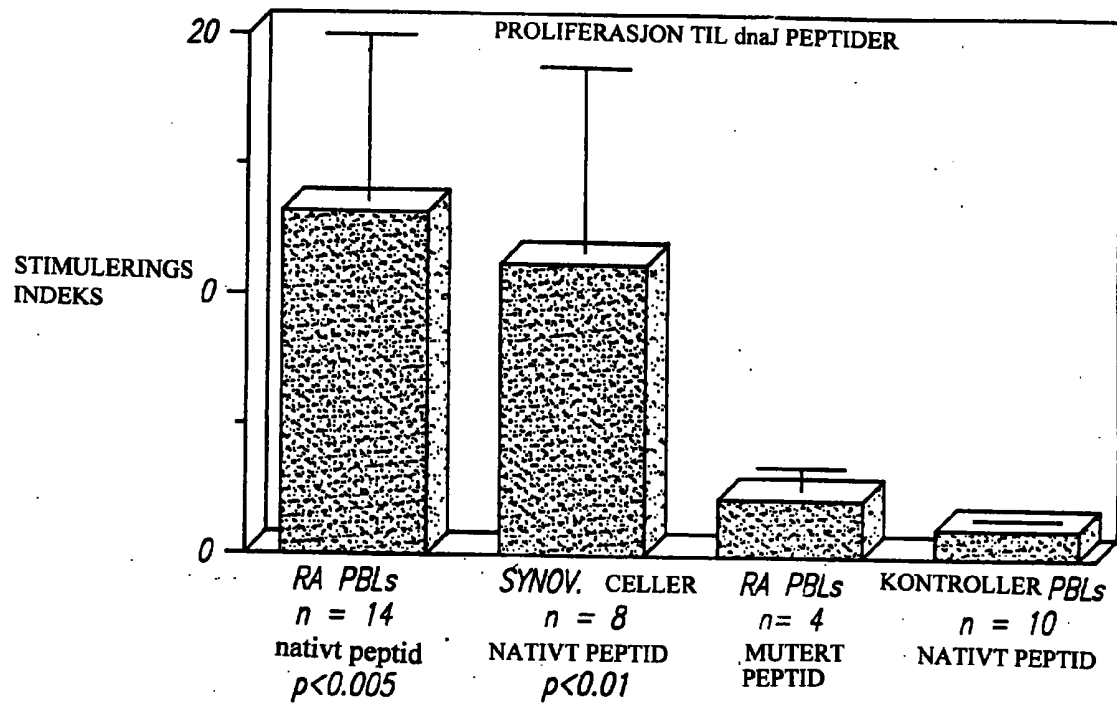


FIG. 3

