(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/30
A61K 39/008
C07K 14/44

(45) 공고일자 2003년03월15일
(11) 등록번호 10-0358271
(24) 등록일자 2002년10월11일

(21) 출원번호	10-1996-0705904	(65) 공개번호	특1997-0702367
(22) 출원일자	1996년10월22일	(43) 공개일자	1997년05월13일
번역문제출일자	1996년10월22일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/05064	(87) 국제공개번호	WO 1995/29239
(86) 국제출원일자	1995년04월24일	(87) 국제공개일자	1995년11월02일

(81) 지정국 국내특허 : 기네 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 베트남 중국 에스토니아 그루지야 아이슬란드 라이베리아 리투아니아 라트비아 멕시코 싱가포르 슬로베니아 트리니다드토바고 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 케냐
EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 아르메니아 키르기즈 몰도바 타지키스탄
EP 유럽특허 : 스페인 핀랜드
OA OAPI특허 : 코트디브와르

(30) 우선권주장 08/232,534 1994년04월22일 미국(US)

(73) 특허권자 코릭사 코포레이션
미국 워싱턴주 98104 시애틀 스위트 200 콜럼비아 스트리트 1124
(72) 발명자 리드 스티븐 지
미국 워싱톤 98005 벨러뷰 122번 플레이스 노쓰이스트 2843
(74) 대리인 이병호

심사관 : 권오희

(54) 보호성면역반응및IL-12생산의자극과증강을위한화합물및방법

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 단리된 세포 및 세포 배양물에서 뿐만 아니라 환자에서 면역 반응을 자극하기 위한 화합물 및 방법, 및 레슈마니아(Leishmania)-감염된 환자를 평가하기 위한 화합물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 더욱 특히 진핵 세포 개시 인자 4A(eIF4A)의 동족체인 레슈마니아 브라질렌시스(Leishmania braziliensis) 항원(LbeIF4A)의 전부 또는 일부분을 포함하는 화합물, 및 Th1 면역 반응을 자극하기 위한 이러한 화합물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 레슈마니아는 자가-치유 피부 병소, 범발성 피부 및 점성 증상 및 중증의 내장 질환을 포함하는 다양한 사람 질환을 일으키는 대식구의(macrophage) 편성 세포내 원생동물 기생충이다. 레슈마니아증 증례의 수는 매년 진단된 새로운 경우만 약 2백만건으로 지난 20년동안 극적으로 증가하였다. 이 질환의 수많은 사례가 전세계적으로, 주로 브라질, 중국, 동 아프리카, 인도 및 중동 등에 나타나고 있다. 이 질환은 또한, 남부 프랑스, 이탈리아, 그리이스, 스페인, 포루투칼 및 북아프리카를 포함하는 지중해 지역에서도 유행하고 있다.

<3> 사람을 감염시키는 20종의 레슈마니아가 있다. 이들 중에, 레슈마니아 브라질렌시스는 통상적으로 국소화된 피부 레슈마니아증(CL)을 일으킨다. CL 환자는 진행중인 질환 또는 치료된 질환 동안에 레슈마니아 항원에 대해 강한 지연형 과민증(DTH) 및 시험관내 증식성 반응을 나타낸다. 대부분의 CL 환자는 자연적으로 치유된다. 그러나, 몇몇 감염된 환자에서는, 비강, 구강 및/또는 인두 점막성 막의 중증의 진행성 파괴로 특징되는 활성 피부 질환 또는 점막성 레슈마니아증(ML)이 발생한다. 최근의 증거들로부터, TH1 효능기(effector) 세포 발달을 유도할 수 있는 IL-12가 엘.메이저(L.major) 감염을 치유하는데 도움이 될 수 있음이 제시되었다[참조: Trinchieri, Immunol. Today 14:335-337, 1993]. 프로마스티고트(promastigote)는 대식구-매개된 면역반응에 가장 민감한 것으로 보이고, 프로마스티고트는 IL-12 생성을 유도하지 않는 것으로 밝혀졌다[참조: Reiner et al., J. Exp. Med. 179:447-456, 1994].

<4> 레슈마니아증의 초기 진단이 성공적인 치료에 중요할 수 있으나, 질환의 분명한 징후 또는 증상이 없기 때문에 초기진단이 곤란하다. 기생충 검출 방법이 사용되었으나, 이러한 방법은 민감하지도 않고

실용적이지도 않다. (예를 들어 ELISA 또는 면역형광 기술을 사용하는) 최근의 혈청학적 시험은 통상적으로 완전한 또는 용해된 기생충을 사용하고, 일반적으로 민감하지 않고 다양한 기타 질환과 교차 반응하는 경향이 있다. 또한, 이러한 방법은 종종 질환의 급성 단계동안 존재하는 항체의 검출에 의존하기 때문에, 잠재적으로 치명적인 질환을 효과적으로 치료하기에 충분한 초기단계에서 알아내지 못한다.

<5> 활성 점막성 질환의 경우에, 레슈마니아 항원에 대한 피내 피부 시험 및 임파구 증식 반응이 예외적으로 강하다. 사실, 점막성 병소와 연관된 조직 파괴가 부분적으로는 레슈마니아 항원에 대한 과민반응의 결과일 수 있다. 그러나, 레슈마니아에 대한 세포-매개 면역 반응에 관여하는 특이적 항원의 특성이 파악되지 않았다.

<6> 따라서, 당업계에서 면역 반응에 관련된 레슈마니아 항원의 특성을 파악하고 질환의 발현에서의 이들의 역할을 판정할 필요가 있다. 또한, 질환의 초기 단계에서 환자를 평가하기 위한 개선된 방법 및 레슈마니아증을 치료하기 위한 개선된 방법을 밝힐 필요성이 있다. 본 발명은 이러한 필요성을 충족시키고 추가로 기타 관련된 이점을 제공한다.

<7> 발명의 요지

<8> 본 발명은 진핵세포 라이보좀 단백질 eIF4A와 유사한 레슈마니아, 항원 LbeIF4A에 관련된 화합물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 한 면으로, LbeIF4A, 이의 부분 또는 이의 변이체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 이러한 DNA 서열을 (a)서열확인번호: 1의 115번 내지 1323번 뉴클레오타이드; (b)엄격한 조건하에서 서열확인번호: 1의 115번 내지 1323번 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 하이브리드되고, 레슈마니아-감염된 개체로부터 수득되는 말단 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩타이드를 암호화 하는 DNA 서열; 및 (c)상술한 DNA 서열중 하나에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA로 이루어진 그룹중에서 선택된다.

<9> 관련된 면에서, 본 발명은 상술된 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터: 이러한 발현 벡터로 형질전환된 또는 형질감염된 숙주 세포; 및 발현을 촉진하는 조건하에서 형질전환된 또는 형질감염된 숙주 세포를 배양하고 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 상술한 DNA 분자에 의해 암호화되는 폴리펩타이드의 제조 방법을 제공한다. 상술된 DNA 분자에 의해 암호화되는 아미노산의 서열 또는 서열 확인번호: 2의 49번 내지 403번 아미노산의 서열을 포함하는 정제된 폴리펩타이드(또는 보존적인 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체)가 또한 제공된다. 또한, 이러한 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체가 기술된다.

<10> 다른 면으로, 본 발명은 환자로부터 수득된 생물학적 샘플을 본원에서 서술된 폴리펩타이드와 접촉시키고 세포의 반응을 측정하는 단계를 포함하는, 면역 반응을 일으키는 환자의 능력을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 생물학적 샘플은 말초 혈액 단핵 세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 또는 이의 배합물을 포함할 수 있다. 측정된 반응은 (1)증식성 반응; (2)인터페론-γ, 인터페론-2, 인터페론-12 p70, 인터페론-12 p40 서브유닛, 인터페론-1 또는 종양 괴사 인자-α와 같은 하나 이상의 사이토킨의 분비; 또는 (3)인터페론-γ, 인터페론-2, 인터페론-12 p40 서브유닛, 인터페론-1 또는 종양 괴사 인자-α와 같은 하나 이상의 사이토킨을 암호화하는 mRNA의 발현일 수 있다.

<11> 또 다른 면으로, 환자에 본원에서 서술된 폴리펩타이드 및 항원을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 항원에 대한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공한다. 폴리펩타이드는 이종성 항원 제제와 함께 또는 기타 레슈마니아 항원과 함께 투여될 수 있다. 관련된 면으로, 본 발명은 본원에서 서술된 폴리펩타이드를 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 라슈마니아 기생충에 결합하는 항체의 생성을 자극하는 방법을 제공한다.

<12> 또 다른 면에서, 본원에서 서술된 폴리펩타이드를 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 Th1 면역 반응, IL-12 생성 및/또는 인터루킨-10 발현의 하향-조절을 자극하기 위한 방법이 제공된다. 관련된 면에서, 생물학적 샘플을 본원에서 서술된 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 Th1 면역 반응, IL-12 생성 및/또는 인터루킨-10 발현의 하향-조절을 자극하기 위한 방법이 제공된다. 생물학적 샘플은 말초 혈액 단핵 세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 또는 이의 배합물을 포함할 수 있다.

<13> 또 다른 면에서, 본 발명은 항원이 레슈마니아로 감염되지 않은 개체로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포 또는 대식구와 같은 세포에 의해 인터루킨-12의 생성을 자극할 수 있는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 백신 조성물의 제조를 위한 항원의 적합성을 측정하기 위한 방법을 제공한다.

<14> 기타면에서, 본원에서 서술된 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물 및 본원에서 서술된 폴리펩타이드 및 항원을 포함하는 백신이 또한 제공된다.

<15> 또 다른 면에서, 본원에서 서술된 폴리펩타이드를 환자에 투여하는 단계를 포함하는, IL-12 자극에 반응성인 질환으로 고통받는 환자를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

<16> 본 발명의 이들 및 기타 면은 하기 상세히 서술되고 첨부된 도면을 참조로 분명해 질 것이다. 본원에서 서술된 모든 참조문헌은 각각 개개로 삽입된 바와 같이 전체로서 참조문헌으로 본원에서 삽입된다.

도면의 간단한 설명

<17> 도 1은 레슈마니아 eIF4A 동족체가 보존되고 엘.브라질렌시스 게놈성 DNA가 2이상의 LbeIF4A 복사체를 함유하는 것을 의미하는, 레슈마니아 spp. DNA의 서던 블롯 분석 결과를 나타낸다.

<18> 도 2는 LbeIF4A 면역 토끼 혈청이 상이한 레슈마니아 종에서 약 45kDa 크기의 하나의 주된 단백질 종과 반응하는 것을 증명하는 면역블롯 분석의 결과를 보여준다.

<19> 도 3은 엘.브라질렌시스-감염된 개체로부터 PBMC의 증식을 자극하는 정제된 재조합 LbeIF4A의 능

력을 예시한다.

<20> 도 4a 및 4b는 엘.브라질렌시스 감염이 확인된 환자로부터의 PBMC의 사이토킨 mRNA 발현 패턴의 분석으로 수득된 결과를 나타낸다.

<21> 도 5는 LbeIF4A 또는 기생충 용균물로 자극한후 엘.브라질렌시스-감염된 개체의 PBMC로부터 분비된 IFN-r의 상청액 수준을 도시한다.

<22> 도 6은 LbeIF4A 또는 기생충 용균물로 자극한 엘.브라질렌시스-감염된 개체의 PBMC의 상층액중 검출되는 TNF-α의 수준을 보여준다.

<23> 도 7a 내지 7d는 LbeIF4A가 또한 환자 PBMC를 자극하여, 기생충 용균물에 의해 자극된 IL-12 수준보다 상당히 더욱 높은 수준으로, 배양된 상층액에 IL-12를 분비시키며, IL-10이 이러한 IL-12 생성을 억제하는 것을 보여준다.

<24> 도 8a 및 8b는 시험된 모든 환자 PBMC에서, INF-γ 생성은 IL-12 의존성이고 IL-10에 의해 억제됨을 증명한다.

<25> 도 9a 및 9b는 LbeIF4A가 배양된 사람 대식구 및 부착성 PBMC에서 IL-12 생성을 자극하는 것을 보여준다.

<26> 도 10은 LbeIF4A가 사람 골수성 백혈병 세포주 THP-1에서 IL-12 생성을 자극하고 INF-γ와 상승작용하여 IL-12를 분비하도록 THP-1 세포를 자극하는 것을 나타낸다.

<27> 도 11은 LbeIF4A로 프라이밍된(primed) 마우스의 림프절 세포가 증식하여 거의 배타적인 Th1 사이토킨 프로파일을 분비하는 반면, 또 다른 재조합 엘.브라질렌시스 항원(8E)로 프라이밍된 마우스로부터의 림프절 세포는 사용된 보조제에 의존하여 Th0 또는 Th1/Th2 타입 사이토킨 프로파일을 생성하고, 기생충 용균물로 프라이밍된 마우스는 혼합된 사이토킨 프로파일을 생성하는 것을 의미하는 결과를 나타낸다.

<28> 도 12는 LbeIF4A가 사람 질환과 관련이 있는 것으로 인식된 동물 모델에서 엘.메이저 감염에 대한 상당한 보호를 제공하는 것을 증명한다.

발명의 상세한 설명

<29> 상술한 바와 같이 본 발명은 환자를 평가하고 환자에서 뿐 아니라 단리된 세포 및 세포 배양물에서 면역 반응을 자극하고 증강시키기 위해 유용한 화합물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 일반적으로 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 Th1 면역반응을 자극하는 폴리펩타이드 또는 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 포함한다. 특히, 진핵세포 라이보좀 단백질 eIF4A의 레슈마니아 브라질렌시스 동족체(LbeIF4A)의 전부 또는 자극성 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 기술한다. 본원에서 사용된 용어 "PBMC"는 말초 혈액중 존재하는 핵 세포의 제제를 의미한다. 본 발명의 명세서에서 용어 "폴리펩타이드"는 아미노산 잔기가 공유적 펩타이드 결합에 의해 연결된 전체 길이의 단백질 및 이의 일부분을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다. 그러므로, "LbeIF4A 폴리펩타이드"는 LbeIF4A 또는 자극 활성을 유지하는 이의 일부분 또는 이의 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 폴리펩타이드가 실질적으로 내인성 물질의 오염없는 것이다. 환자의 면역 반응을 평가하기 위한 및 다양한 면역 반응의 자극 및 증강을 위한 이러한 폴리펩타이드의 용도가 또한 기술된다.

<30> 본 발명의 폴리펩타이드는 PBMC에서 Th1 면역 반응을 자극하는 능력을 유지하는 LbeIF4A의 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 일차 단백질의 다양한 구조 형태를 포함한다. 이온화가능한 아미노 및 카복실 그룹의 존재로 인해, 예를 들어 LbeIF4A 폴리펩타이드는 산성 또는 염기성 염의 형태일 수 있거나 중성 형태일 수 있다. 개개의 아미노산 잔기는 산화 또는 환원에 의해 변형될 수도 있다.

<31> 본 발명의 기술적 범위내의 변이체는, 또한 LbeIF4A의 일차 아미노산 구조 또는 이의 단편이 다른 폴리펩타이드 또는 글리코실 그룹, 지질, 포스페이트 및 아세틸 그룹 등과 같은 화학적 잔기와 공유적 접합체 또는 집합적 접합체를 형성함으로써 변형된다. 공유적 유도체는, 예를 들어 아미노산 측쇄 또는 N- 또는 C-말단에 특정 작용 그룹을 연결함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로 폴리펩타이드가 LbeIF4A 폴리펩타이드에 연결된 유도체에 있어서, 융합 단백질이 후술되는 바와 같이 재조합 DNA를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 실시양태로서, LbeIF4A 폴리펩타이드는 동시-해독적으로 또는 후-해독적으로 합성 부위로부터 세포막 또는 세포벽의 내부 또는 외부의 이의 작용 부위로 단백질의 전달을 지시하는 단백질의 N-말단 영역의 시그날(또는 리더) 폴리펩타이드 서열(예: 효모 α-인자 리더)과 접합될 수 있다.

<32> 본 발명의 영역내의 융합 단백질은 LbeIF4A 폴리펩타이드의 정제 또는 확인을 용이하게하기 위해 첨가되는 펩타이드(예: 폴리-His)을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 문헌[참조: Hopp et al., Bio/Techechnology 6: 1204 (1988)]에 서술된 펩타이드는 확인을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 매우 항원성인 펩타이드이다. 이러한 펩타이드는 발현된 재조합 단백질의 신속한 검정 및 용이한 정제를 가능하게 하는 특이적 모노클로날 항체에 의해 가역적으로 결합되는 에피토프를 제공한다. 호프 등의 서열은 또한 정제된 단백질로부터 펩타이드의 제거를 가능하게 하는 소의 점막성 엔테로키나아제에 의해 특이적으로 절단된다. 이러한 펩타이드로 캡핑된 융합 단백질은 이.콜라이에서 세포내 분해에 내성이 있을 수도 있다.

<33> 본 발명에 포함되는 융합 단백질은 추가로 예를 들어, 면역글로블린 Fc 영역에 연결된 LbeIF4A 폴리펩타이드를 포함한다. LbeIF4A 융합 단백질이 항체의 중쇄 및 단쇄와 함께 제조된 경우, 4개의 LbeIF4A 단백질 영역으로 단백질 올리고머를 형성할 수 있다. 루이신 지퍼 도메인에 연결된 LbeIF4A 폴리펩타이드는 본 발명의 영역내이다. 루이신 지퍼 도메인은, 예를 들어 공개된 PCT 출원번호 WO 제94/10308호에서 서술된다. 루이신 지퍼를 포함하는 LbeIF4A 폴리펩타이드는, 예를 들어 올리고머, 이량체 또는 단량체일 수 있다. 모든 상기 융합 단백질은 후술된 바와 같이 융합 단백질로서 또는 화학적 연결에 의해 제조될 수 있다.

<34> 본 발명은 또한 천연-패턴의 글리코실화와 연관된 또는 연관되지 않은 LbeIF4A 폴리펩타이드를 포함한다. 효모 또는 포유동물 발현 시스템에서 발현된 폴리펩티드는 발현 시스템에 의존하여, 천연 분자보다 분자량 및 글리코실화 패턴에서 유사하거나 조금 상이하다. 예를 들어, 이.콜라이와 같은 세균에서 LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 발현은 글리코실화되지 않은 분자를 제공한다. 진핵세포 단백질의 N-글리코실화 부위는 아미노산 삼중물 Asn-A_1-Z(여기서, A_1은 Pro을 제외한 임의의 아미노산이고 Z는 Ser 또는 Thr이다)로 특징된다. 불활성화된 N-글리코실화 부위를 갖는 LbeIF4A 폴리펩타이드의 변이체는 당업자에게 공지된 기술(예: 올리고뉴클레오타이드 합성 및 연결 또는 부위-특이적 돌연변이 기술)에 의해 생산될 수 있고 본 발명의 영역내이다. 대안적으로, N-연결된 글리코실화 부위는 LbeIF4A 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다.

<35> 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 결실, 삽입, 치환 또는 기타 변형으로 인해 천연 LbeIF4A 단백질과 상이한 아미노산 서열을 가진 LbeIF4A 폴리펩타이드의 변이체를 또한 포함한다. 이러한 변이체는 천연 LbeIF4A에 실질적으로 상동성이어야 하고 PBMC에서 Th1 면역 반응을 자극하는 능력을 유지하여야 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적인 상동성"은 적당히 엄격한 조건하에서 LbeIF4A를 암호화하는 천연 DNA 서열에 하이브리드화될 수 있는 DNA 서열에 의해 암호화될 수 있는 아미노산 서열을 의미한다. 적합한 적당히 엄격한 조건은 5xSSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA(pH8.0)의 용액에서 예비세척하고; 50℃ 내지 65℃에서 5 X SSC로 밤새 하이브리드화한 후; 0.1% SDS를 함유하는 2×, 0.5× 및 0.2×SSC로 각각 65℃에서 20분동안 2회 세척하는 것을 포함한다. 이러한 하이브리드화 DNA 서열은 또한 본 발명의 영역내이고, 코드 축퇴성(degeneracy)으로 인해 DNA 서열을 하이브리드화함으로써 암호화되는 자극성 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열도 그러하다. LbeIF4A 폴리펩타이드의 활성에 대한 임의의 이러한 변형의 효과는 돌연변이된 LbeIF4A 펩타이드의 능력을 분석함으로써 용이하게 측정하여 예를 들어 임의의 본원에서 서술된 방법을 사용하여 Th1 반응을 유도할 수 있다.

<36> 일반적으로, 아미노산 치환은 보존적이어야 하는데, 즉 펩타이드 화학 분야의 업자가 폴리펩타이드의 2차 구조 및 수치료 특성이 실질적으로 변하지 않을 것으로 예상하는, 치환 아미노산이 유사한 특성을 가진 아미노산을 대체하도록 한다. 일반적으로, (1)ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2)cys, ser, tyr, thr; (3)val, ile, leu, met, ala, phe; (4)lys, arg, his; 및 (5)phe, tyr, trp, his의 아미노산 그룹이 보존적인 변화를 나타낸다. 본 발명의 영역내의 변이체는 또한 또는 대안적으로 폴리펩타이드의 자극 특성, 2차 구조 및 수치료 특성에 대해 최소의 영향을 미치는 아미노산의 결실 또는 첨가를 포함하는 기타의 변형을 함유할 수 있다. 일반적으로, LbeIF4A의 단편은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실시킴으로써 작제될 수 있다. 적합한 변이에 대한 추가의 지표는, LbeIF4A의 서열과 기타의 eIF4A계 막의 서열 및 구조를 비교함으로써 수득될 수 있다. 예를 들어 생물학적 활성이 필요하지 않은 LbeIF4A의 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실시킬 수 있다. 시스테인 잔기를 결실시키거나 기타 아미노산으로 치환시켜 재생시 부정확한 분자내 디설파이드 결합의 형성을 방지할 수 있다. 돌연변이 유발에 대한 다른 접근은 KEX2 프로테아제 활성이 존재하는 효모 시스템에서 발현을 증강시키는 인접한 이염기성 아미노산 잔기의 변형을 포함한다.

<37> 전체 길이의 LbeIF4A 단백질은 일반적으로 단백질을 암호화하는 게놈성 또는 cDNA 클론을 사용하여 수득할 수 있다. 전체 길이의 LbeIF4A를 암호화하는 게놈성 서열을 서열확인번호: 1에 나타내고, 유추된 아미노산 서열을 서열확인번호: 2에 나타낸다. 이러한 클론을 점막성 레슈마니아증으로 고통 받는 환자로부터의 혈청과 반응하는 항원을 발현하는 클론를 찾기 위해 적합한 레슈마니아 브라질렌시스 발현 라이브러리를 스크리닝하고 이어 환자의 T 세포 검정에서 증식성 반응 및 우선적인 Th1 사이토킨 생성을 자극할 수 있는 능력에 대해 반응성 항원을 분석함으로써 단리할 수 있다. 라이브러리 제조 및 스크리닝을 일반적으로 본원에서 참조 문헌으로 삽입된 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]에 서술된 방법과 같은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 요약하면, 박테리오파아지 발현 라이브러리를 플레이팅하고 필터에 옮긴다. 필터를 혈청 및 검출 시약과 함께 항온처리할 수 있다. 본 발명의 명세서에서, "검출 시약"은 항체-항원 복합체에 결합할 수 있는 임의의 화합물이고, 이는 당업자에게 공지된 임의의 다양한 수단으로 검출될 수 있다. 통상적인 검출 시약은 리포터 그룹에 커플링되는 단백질 A, 단백질 G, IgG 또는 렉틴과 같은 "결합제"를 함유한다. 바람직한 리포터 그룹은 효소, 기질, 보조인자, 억제인자, 염료, 방사핵종, 발광 그룹, 형광 그룹 및 바이오틴을 포함한다. 더욱 바람직하게는 리포터 그룹은 고추냉이 과산화효소이고, 이는 테트라메틸벤지딘 또는 2,2'-아지노-디-3-에틸벤즈티아졸린 설폰산과 같은 기질과 함께 항온처리함으로써 검출하여 측정될 수 있다. 혈청에서 항체에 결합하는 단백질을 발현하는 게놈성 또는 cDNA 서열을 함유하는 플라크를 당업자에게 공지된 기술로 단리하고 정제한다. 적합한 방법은 예를 들어 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]에서 발견할 수 있다.

<38> 환자의 T 세포 검정은 일반적으로 환자 PBMC를 반응성 항원으로 처리하고 적합한 반응에 대해 세포를 분석함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, PBMC 상층액은 분비된 사이토킨의 수준에 대해 검정될 수 있다. 바람직하게는 검정되는 사이토킨이 인터페론-γ, 인터루킨-2, 인터루킨-12(p40 서브유닛 또는 생물학적으로 활성인 p70 서브유닛), 인터루킨-1 또는 종양 괴사 인자-α이다. 사이토킨은 예를 들어 ELISA 포맷에서 대상 사이토킨에 특이적인 시판되는 항체를 사용하여 검정되고, 제조자의 지침에 따라 양성 결과가 측정된다. 적합한 항체는 예를 들어 케미콘(Chemicon, Temucula, CA) 및 파미젠(PharMingen, San Diego, CA)로부터 구입할 수 있다. 대안적으로, 처리된 PBMC를 하나 이상의 사이토킨 인터페론-γ, 인터루킨-2, 인터루킨-12 p40 서브유닛, 인터루킨-1 또는 종양 괴사 인자-α를 암호화하는 mRNA에 대해 검정할 수 있거나 PBMC를 본원에서 서술된 증식성 반응에 대해 검정할 수 있다.

<39> PBMC에서 Th1 면역 반응을 자극하는 능력을 보유하는 LbeIF4A의 변이체는 상술된 하나 이상의 면에서 서열을 변형함으로써 확인될 수 있고, Th1 반응을 자극하는 능력에 대해 생성된 폴리펩타이드를 검정함으로써 확인될 수 있다. 이러한 검정은 상술된 바와 같이, 변형된 폴리펩타이드로 환자의 PBMC를 처리하고 반응을 검정함으로써 수행할 수 있다.

<40> 상술된 서열 변형은 표준적인 재조합 기술을 사용하거나, 또는 변형된 폴리펩타이드를 자동 합성

하여 도입할 수 있다. 예를 들어 돌연변이를, 돌연변이체 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하고 천연 서열의 단편에 연결가능한 제한 부위를 플랭킹시킴으로써 특정 위치에 도입할 수 있다. 연결후, 생성된 재작제된 서열은 목적하는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 갖는 동족체이다.

<41> 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드-지시된 부위-특이적 돌연변이유발 방법을 사용하여 필요한 치환, 결실 또는 삽입에 따라 특정 코돈을 변화시킨 유전자를 제공한다. 상술된 변화를 일으키는 예시적인 방법은 문헌[참조: Walder et al., Gene 42: 133, 1986; Bauer et al., Gene 37: 73, 1985; Craik, BioTechniques, January 1985. 12-19; Smith et al., Genetic Engineering: Principle and Methods, Plenum Press, 1981; and U.S. Patent Nos. 4,518,584 and 4,737,462]에 기술되어 있다.

<42> 이러한 LbeIF4A 폴리펩타이드의 발현을 위해 작제된 뉴클레오타이드 서열에서 돌연변이는, 암호화 서열의 판독 프래임을 보존하여야 하며, 바람직하게는 하이브리드화함으로써 수용체 mRNA의 해독에 악영향을 미치는 고리 또는 머리핀 구조와 같은 2차 mRNA 구조를 만들수 있는 상보적인 영역을 생성하지 않아야 할 것이다. 비록 돌연변이 부위가 예정될 수 있을지라도, 돌연변이 자체의 특징이 예정되어 있을 필요는 없다. 예를 들어 주어진 부위에서의 돌연변이체 최적 특징을 선별하기 위해, 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈에서 수행 할 수 있고 발현된 LbeIF4A 단백질 돌연변이체를 목적 활성에 대해 스크리닝할 수 있다.

<43> LbeIF4A 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에서 모든 돌연변이가 최종 생성물에서 발현되는 것은 아니다. 예를 들어 뉴클레오타이드 치환은 발현을 증강시킬 수 있고, 주로 전사된 mRNA에서 2차 고리 구조를 피할 수 있거나(예: 유럽특허출원 제75,444A호), 이.콜라이 발현을 위한 공지된 이.콜라이 우선 코돈과 같은, 선별된 숙주에 의해 용이하게 해독되는 코돈을 제공한다.

<44> 천연 폴리펩타이드 및 변형된 폴리펩타이드, 모두의 본 발명의 폴리펩타이드는 바람직하게는 재조합 DNA 방법에 의해 생성된다. 이러한 방법은 LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 재조합 발현 벡터내로 삽입하고 발현을 촉진시키는 조건하에서 재조합 미생물 발현 시스템에서 DNA 서열을 발현시키는 것을 포함한다. 본 발명에 의해 제공된 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 cDNA 단편 및 짧은 올리고뉴클레오타이드 링커로부터, 또는 한 시리즈의 올리고뉴클레오타이드로부터 조립되어, 재조합 발현 벡터에 삽입될 수 있고 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공할 수 있다.

<45> 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충의 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 해독 조절 요소에 작동적으로 연결된 LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 함유한다. 이러한 조절 요소는 후술하는 바와 같이 전사 프로모터, 전사를 조절하는 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 라이보좀 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 복제 기원 및 형질전환체의 식별을 용이하게 하기 위한 선별가능 마커를 추가로 삽입할 수 있다.

<46> DNA 영역은 이들이 각각 기능적으로 연관된 경우 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 분비에 관여하는 전구체로서 발현되는 경우 시그날 펩타이드(분비성 리더)에 대한 DNA는 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되고; 서열의 전사를 조절하는 경우 프로모터가 암호화 서열에 작동적으로 연결되거나; 해독이 가능하도록 위치하는 경우 라이보좀 결합 부위가 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된" 이란 연속적인 것을 의미하고, 분비성 리더의 경우에 판독 프레임중에 있는 것을 의미한다. 미생물에서 발현되는 LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 바람직하게는 DNA의 mRNA로의 전사를 미성숙하게 종결시킬 수 있는 인트론을 함유하지 않을 것이다.

<47> 세균에 사용하기 위한 발현 벡터는 선별가능 마커 및 공지된 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 유전적 요소를 포함하는 시판되는 플라스미드로부터 유도된 세균의 복제 기원을 포함한다. 이러한 시판되는 벡터에는, 예를 들어 pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 및 pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)이 포함된다. 이들 pBR322 "골격" 부분은 적합한 프로모터 및 발현될 구조 서열과 조합된다. 이.콜라이를, 통상적으로 이.콜라이 종(Bolivar et al., Gene 2: 95, 1977)으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 앰피실린 및 테트라사이클린 내성 유전자를 함유하고 형질전환된 세포를 확인하기 위한 단순한 수단을 제공한다.

<48> 재조합 미생물 발현 벡터에서 통상적으로 사용되는 프로모터에는 β-락타마아제(페니실리나아제) 및 락토즈 프로모터 시스템[참조: Chang et al., Nature 275; 615. 1978, and Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979], 트립토판(trp) 프로모터 시스템[참조: Goeddel et al., Nucl. Acids Res 8: 4057, 1980; 및 유럽특허출원 제36,776호] 및 tac 프로모터[참조: Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, p412, 1982]가 포함된다. 특히 유용한 세포 발현 시스템은 파아지 1 P_L 프로모터 및 c1857ts 열분해성 억제인자를 사용한다. 1 P_L 프로모터의 유도체가 삽입된, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렌션으로부터 입수가능한 플라스미드 벡터에는 이.콜라이 균주 JMB9에 내재하는 플라스미드 pHUB2(ATCC 37092) 및 이.콜라이 RR1에 내재하는 pPLc28(ATCC 53082)가 포함된다.

<49> 효모 벡터에서 적합한 프로모터 서열은 메탈로티오네인, 3-포스포글리세레이트 키나아제[참조: Hitzeman et. a., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980], 또는 에놀리아제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나아제, 헥소키나아제, 피루베이트 데카복실라아제, 포스포프락토키나아제, 글루코즈-6-포스페이트 이소머라아제, 3-포스포글리세레이트 뮤타아제, 피루베이트 키나아제, 트리오세포스페이트 이소머라아제, 포스포글루코즈 이소머라아제 및 글루코키나아제와 같은 기타 해당 효소[참조: Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968; 및 Holland et al., Biochem. 17; 4900, 1978]에 대한 프로모터를 포함한다. 효모 발현에서 사용하기 위한 적합한 벡터 및 프로모터는 문헌[참조: R. Hitzeman et al., 유럽특허출원 제73,657호]에 서술되어 있다.

<50> 바람직한 효모 벡터는 이.콜라이에서 선별 및 복제를 위한 pBR322로부터의 DNA 서열(Amp^r 유전자 및 복제기원) 및 글루코즈-억제가능한 ADH2 프로모터 및 α-인자 분비 리더를 포함하는 효모 DNA 서열을 사용하여 조립할 수 있다. ADH2 프로모터는 문헌[참조: Russell et. al., J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982 and Beier et al., Nature 300: 724, 1982]에 서술되어 있다. 이종성 단백질의 분비를 지시하는 효모 α-인자 리더를 프로모터와 발현될 구조 유전자사이에 삽입할 수 있다[참조: Kurjan et al., Cell 30:

933, 1982; and Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984]. 리더 서열을 이의 3' 말단 근처에 하나 이상의 유용한 제한 부위를 함유하도록 변형시켜, 외래 유전자에 리더 서열이 융합되는 것을 용이하게 할 수 있다. 척추동물 세포를 형질전환시키는데 사용되는 발현 벡터중 전사 및 해독 조절 서열은 바이러스 공급원에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터 및 인헨서는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시미안 바이러스 40(SV40) 및 사람 사이토메갈로바이러스로부터 유래된다. SV40 바이러스 게놈으로 부터 유래된 DNA 서열, 예를 들어 SV40 기원, 초기 및 후기 프로모터, 인헨서, 스플라이싱 부위 및 폴리아데닐화 부위를 사용하여 이종성 DNA 서열의 발현을 위해 필요한 기타 유전적 요소를 제공한다. 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기원을 함유하는 단편으로 바이러스로부터 용이하게 수득되기 때문에 특히 유용하다[참조: Fiers et al., Nature 273: 113, 1978]. HindIII 부위로부터 바이러스 복제 기원중 위치된 BglI 부위에 이르는 대략 250bp 서열이 포함되는 경우, 더욱 짧은 또는 더욱 긴 SV40 단편이 또한 사용될 수 있다. 추가로, 상기 조절 서열이 선택된 숙주에 적합한 경우, 바이러스 게놈 프로모터, 조절 및/또는 시그날 서열이 사용될 수 있다. 예시적인 벡터는 문헌[참조: Okayama and Berg, Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983]에 기술된 바와 같이 작제될 수 있다.

<51> C127 쥐 유방 상피세포에서 포유동물 수용체 cDNA의 안정한 고발현에 유용한 시스템은 문헌[참조: Cosman et al., Mol. Immunol. 23: 935, 1986]에 의해 서술된 바와 같이 실질적으로 작제될 수 있다. LbeIF4A 단백질 DNA의 발현을 위한 바람직한 진핵세포성 벡터는 pDC406[참조: McMahan et al., EMBO J. 10: 2821, 1991]이고 SV40, 사람 면역결핍 바이러스(HIV) 및 엡스타인-바 바이러스(EBV: Epstein-Barr Virus로부터 유래된 조절 서열을 포함한다. 기타 바람직한 벡터에는 pDC406으로부터 유래된 pDC409 및 pDC410이 포함된다. pDC410은 EBV 복제 기원을 SV40 대형 T항원을 암호화하는 서열로 치환시킴으로써 pDC406으로부터 유도된다. pDC409는, 여러 클로닝 부위중에서 BglII 제한 부위를 결실시켜, 여러 클로닝 부위내에 BglII 부위가 유일하도록 된 점에서 상이하다.

<52> EBV 복제 기원을 함유하는 pDC406 및 pDC409와 같은 발현 벡터의 에피좀 복제를 위한 유용한 세포주는 CV-1/EBNA(ACTT CRL 10478)이다. CV-L/EBNA 세포주는 엡스타인-바 바이러스 핵 항원-1(EBNA-1)를 암호화하는 유전자로 CV-1 세포주를 형질감염시킴으로써 유도되고 사람 CMV 최초기(immediate-early) 인헨서/프로모터로 부터 유도된 EBNA-1을 구성적으로 발현시킨다.

<53> 형질전환된 숙주 세포는 재조합 DNA 기술을 사용하여 작제된 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염되고 본 발명의 LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 함유하는 세포이다. 형질전환된 숙주 세포는 목적하는 LbeIF4A 폴리펩타이드를 발현할 수 있으나, LbeIF4A DNA를 클로닝하거나 증폭하기 위한 형질전환된 숙주 세포는 LbeIF4A 단백질을 발현할 필요가 없다. 발현된 LbeIF4A 단백질은 바람직하게는 선별된 DNA에 의존하여 배양 상층액내로 분비되거나 세포막에 축적될 것이다.

<54> 재조합 단백질의 발현을 위한 적합한 숙주 세포에는 적합한 프로모터의 조절하에 있는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포가 포함된다. 원핵세포에는 그램 음성 또는 그램 양성 유기체, 예를 들어 이.콜라이 또는 바실리(bacilli)가 포함된다. 고등 진핵세포에는 후술되는 바와 같은 곤충 또는 포유동물 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 세포-비함유 해독 시스템이 본원에서 기술된 DNA 작제물로부터 유도된 RNA를 사용하여 LbeIF4A 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. 세균, 진균, 효모 및 포유동물 세포성 숙주에 사용하기 위한 적합한 클로닝 및 발현 벡터가 기술된다[참조: Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985].

<55> 원핵세포 발현 숙주는 광범위한 단백질 분해성 및 디설파이드 프로세싱을 필요로하지 않는 LbeIF4A 폴리펩타이드의 발현을 위해 사용될 수 있다. 원핵세포 발현 벡터는 일반적으로 하나 이상의 표현형 선별가능 마커, 예를 들어 항생제 내성을 제공하거나 자가영양 요구를 충족시키는 단백질을 암호화하는 유전자, 및 숙주 내에서 증폭될 수 있게 하는 숙주에 의해 인식되는 복제 기원을 포함한다. 형질전환을 위한 적합한 원핵세포 숙주에는 비록 기타 숙주가 사용될 수도 있지만 이.콜라이, 바실러스 섭틸리스(Bacillus subtilis), 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium), 및 슈도모나스(Pseudomonas), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 및 스타필로코커스(Staphylococcus) 속의 다양한 종이 포함된다.

<56> 재조합 LbeIF4A 폴리펩타이드는 또한 효모 숙주, 바람직하게는 에스, 세레비지에(S. cerevisiae)와 같은 사카로마이세스(Saccharomyces) 종으로부터 발현될 수도 있다. 피키아(Pichia) 또는 클루베로마이세스(Kluyveromyces)와 같은 기타 속의 효모가 또한 사용될 수 있다. 효모 벡터는 일반적으로 2μ 효모 플라스미드로 부터의 복제 기원 또는 자가 복제 서열(AR), 프로모터, LbeIF4A 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 폴리아데닐화 및 전사 종결을 위한 서열 및 선별 유전자를 함유한다. 바람직하게는, 효모 벡터는 복제 기원, 및 효모 및 이.콜라이 모두에서 형질 전환을 가능하게 하는 선별가능 마커(예: 이.콜라이의 앰피실린 내성 유전자 및 트립토판중에서 성장하는 능력이 없는 효모의 돌연변이 균주를 위한 선별마커를 제공하는 에스. 세세비지에 trp1 유전자) 및 하류의 구조 서열의 전사를 유도하는 고 발현된 효모 유전자로부터 유래된 프로모터를 포함한다. 효모 숙주 세포 게놈중 trp1 기능 장애가 존재하면 트립토판 부재하의 성장에 의한 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

<57> 적합한 효모 형질전환 프로토콜은 당업자에게 공지되어 있다. 예시적인 기술[참조: Hind et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978]은 효모 질소 염기 0.67%, 카사미노산 0.5%, 글루코즈 2%, 아데닌 10mg/ml 및 우라실 20mg/ml으로 이루어진 선별 배지중에서 Trp^+ 형질전환체를 선별하는 것을 포함한다. ADH2 프로모터를 포함하는 벡터에 의한 형질전환된 숙주 균주를 아데닌 80mg/ml 및 우라실 80mg/ml로 보충된, 1% 효모 추출액, 2% 펩톤 및 1% 글루코즈로 이루어진 농후 배지중에서 발현시키기 위해 성장시킬 수 있다. ADH2 프로모터의 탈억제는 배지 글루코즈의 고갈시 일어난다. 조 효모 상층액을 여과로 수확하고 추가의 정제에 앞서 4℃에서 유지한다.

<58> 다양한 포유동물 또는 곤충(예: 스포도프테라(Spodoptera) 또는 트리코플루시아(Trichoplusia)) 세포 배양 시스템은 또한 재조합 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 곤충 세포에서 이종성 단백질의 생성을 위한 바큘로바이러스 시스템이 문헌[참조: Luckow and Summers, Bio/Technology 6: 47, 1988]에 서술되어 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예에는 원숭이 신장 세포의 COS-7주[참조: Gluzman, Cell 23: 175, 1981] 및 예를 들어 CV-1/EBNA(ATCC CRL 10478), L 세포, C127, 3T3, 중국산 햄

스터 난소(CHO), COS, NS-1, 헬라 및 BHK 세포주를 포함하는 적합한 벡터를 발현시킬 수 있는 기타 세포주가 포함된다. 포유동물 발현 벡터는 복제 기원, 발현될 유전자에 연계된 적합한 프로모터와 인헨서, 및 기타 5' 또는 3' 플랭킹 비전사 서열과 같은 비전사 요소, 및 5' 또는 3' 비해독 서열원소 (예: 필수적인 라이보좀 결합 부위, 폴리아데닐화 부위 및 스플라이싱 공여체 및 수용체 부위, 및 전사 종결 서열)을 포함할 수 있다.

<59> 정제된 LbeIF4A 폴리펩타이드는 적합한 숙주/벡터 시스템을 배양함으로써 제조되어 본 발명의 DNA의 재조합 해독 생성물을 발현시킬 수 있고, 이를 이후 배양 배지 또는 세포 추출물로부터 정제할 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 배양 배지내로 분비하는 시스템으로부터의 상충액은 우선 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 초원심분리 단위와 같은 시판되는 단백질 농축 필터를 사용하여 농축시킬 수 있다. 농축 단계 이후, 농축물을 적합한 정제 매트릭스에 적용시킬 수 있다. 예를 들어, 적합한 친화 매트릭스는 카운터 구조 단백질(예: LbeIF4A기 구조에 기초한 특이적 상호작용으로 결합하는 단백질) 또는 적합한 지지체에 결합된 렉틴 또는 항체 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지가 예를 들어 부속적인 디에틸아미노에틸(DEAE) 그룹을 갖는 매트릭스 또는 기질을 사용할 수 있다. 매트릭스는 아실아미드, 아가로즈, 덱스트란, 셀룰로즈 또는 단백질 정제에서 통상적으로 사용되는 기타 형태일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계가 사용될 수 있다. 적합한 양이온 교환제에는 설포프로필 또는 카복시메틸 그룹을 포함하는 다양한 불용성 매트릭스가 포함된다. 설포프로필 그룹이 바람직하다. 겔 여과 크로마토그래피는 또한 LbeIF4A를 정제하는 수단을 또한 제공한다.

<60> 친화성 크로마토그래피는 LbeIF4A 폴리펩타이드를 정제하는 특히 바람직한 방법이다. 예를 들어, 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질로서 발현되는 LbeIF4A 폴리펩타이드를 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. 더욱이, 루이신 지퍼 도메인을 포함하는 LbeIF4A 단백질은 루이신 지퍼 도메인에 특이적인 항체를 포함하는 수지상에서 정제될 수 있다. LbeIF4A 단백질에 대한 모노클로날 항체가 당업계에 공지된 방법을 사용함으로써 친화성 크로마토그래피 정제에 유용할 수도 있다.

<61> 최종적으로, 소수성 RP-HPLC 매질(예: 부속적인 메틸 또는 기타 지방족 그룹을 갖는 실리카 겔)를 사용하는 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계가 추가로 LbeIF4A 단백질 조성물을 정제하기 위해 사용될 수 있다. 상술된 정제 단계의 일부 또는 전부가 다양한 조합으로 사용되어 상동 재조합 단백질을 제공한다.

<62> 세균 배양물에서 재조합 LbeIF4A폴리펩타이드를 바람직하게는 세포 펠렛으로부터의 초기 추출에 이어, 1회 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리할 수 있다. 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 최종 정제 단계에 사용될 수 있다. 재조합 LbeIF4A 단백질의 발현에 사용되는 미생물 세포는 동결-해동 순환, 초음파처리, 기계적 파쇄 또는 세포 용균제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 파쇄될 수 있다.

<63> 분비된 단백질로서 LbeIF4A 폴리펩타이드를 발현하는 효모의 발효는 정제를 매우 단순화한다. 대규모의 발효로부터 생성된 분비된 재조합 단백질을 문헌[참조: Urdal et al., J. Chromatog 296: 171, 1984]에 기술된 것과 유사한 방법에 의해 정제할 수 있다. 이러한 참조문헌은 예비 HPLC 칼럼상의 재조합 사람 GM-CSF의 정제를 위한 두 번의 연속적인 역상 HPLC 단계를 서술한다.

<64> 재조합 배양액에서 합성된 LbeIF4A 폴리펩타이드 제제는 단백질을 포함하는 비-LbeIF4A 세포 성분을, 배지로부터 LbeIF4A 단백질을 회수하기 위한 정제 단계에 의존하는 특성 및 양으로 함유할 수 있다. 이들 성분은 효모, 원핵세포 또는 비사람 진핵세포 기원일 수 있고, 바람직하게는 무해한 오염 양, 약 1중량% 미만으로 존재한다. 이러한 제제는 통상적으로 그기원의 종에서 천연적으로 발견되는 바와 같은 LbeIF4A 단백질과 통상적으로 결합될 수 있는 기타의 단백질이 부존재한다.

<65> 자동화된 합성법은 약 100개 미만의 아미노산, 통상적으로 약 50개 미만의 아미노산을 갖는 본 발명의 폴리펩타이드를 제조하기 위한 대안적인 방법을 제공한다. 예를 들어 아미노산이 성장하는 아미노산 쇄에 연속적으로 첨가되는 메리필드(Merrifield) 고체 상 합성 방법이 사용된다[참조: Merrifield, J. Am. Chem, Soc. 85: 2149-2146. 1963]. 폴리펩타이드의 자동 합성을 위한 장비는 공급자[Applied Biosystems. Inc., Foster City. CA]로부터 구입가능하다.

<66> 상술한 폴리펩타이드 및 DNA 서열 뿐만 아니라, 본 발명은 추가로 면역 반응을 평가하기 위한 폴리펩타이드 및 보호성 면역 반응 및 IL-12 생성을 자극하기 위한 폴리펩타이드를 사용하는 방법을 제공한다. LbeIF4A가 레슈마니아-감염된 개체로부터의 PBMC를 자극하여 증식시키는 T 세포 에피토프를 함유한다는 것은 본 발명의 영역내에서 밝혀진다. LbeIF4A는 또한 감염된 개체로부터의 PBMC를 자극하여 Th1 사이토킨 프로파일을 생성한다[참조: Skeiky et al., J. Immunol. 150:93a, 1993]. Th1 반응은 사이토킨 인터루킨-1(1L-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-12(IL-12) 또는 인터페론-γ(IFN-γ) 및 종양 괴사 인자-α(TNF-α)을 생산하는 특징을 갖는다. IL-12는 생물학적으로 활성인 IL-12 p70의 생산을 위해 공동발현되어야 하는 p40 및 p35 서브유닛을 포함하는 헤테로이량체 분자이다. p40 서브유닛은 IL-12-생성 세포에 의해서만 생성되고 세균 및 기생충 자극후 시험관내 및 생체내에서 유도되는 반면, p35 서브유닛은 편재적으로, 구성적으로 발현된다. 그러므로, IL-12를 생성하는 세포는 또한 생물학적으로 불활성인 유리 p40 쇄를 다량(10 내지 100배)으로 갖는다.

<67> LbeIF4A는 또한 레슈마니아 감염된 환자로부터의 PBMC에서 IFN-γ, IL-1, IL-2, IL-12 p40 서브유닛 및 TNF-α를 암호화하는 것과 같은 mRNA의 Th1 사이토킨 프로파일을 또한 자극한다. Th2 반응을 나타내는 검출가능한 IL-4 또는 IL-10이 상기와 같은 자극된 PBMC에는 존재하지 않는다. 사실상, LbeIF4A는 일반적으로, 몇몇 레슈마니아 환자의 "휴지" PBMC에 존재하는 IL-10과 mRNA의 발현은 물론 환자 및 정상인의 PBMC에서의 LPS-유도된 IL-10 생성을 하향조절한다. LbeIF4A의 이런 특성은 엘. 브라질렌시스 감염후 보호성 면역 반응에서 LbeIF4A의 역할을 제시한다.

<68> 또한, LbeIF4A는 감염되지 않은 대조군 개체로부터 수득된 PBMC에서 뿐만아니라 배양된 사람 대식구, 사람 골수성 백혈병 세포주 THP-1 및 마우스에서 IL-12 및 IL-2의 생성을 자극한다. LbeIF4A는 또

한 IFN-γ와 함께 상승작용을 일으켜 THP-1 세포를 자극하여 IL-12를 분비시킨다. 환자 PBMC에 의한 IFN-γ 생성의 유도는 항-IL-12 항체의 존재에 의해 종료된다. IL-12 및 IL-2 생성을 자극할 수 있다는 것은, LbeIF4A가 보호성 면역 반응을 유도하는 능력을 가지고, 또한 본원에서 서술된 폴리펩타이드는 암과 같은 질환 및 감염성 질환의 예방 및 치료에서 광범위하게 이용될 수 있음을 의미한다.

<69> 따라서, 본 발명의 한 면으로, 면역 반응을 일으키는 환자의 전반적인 능력을 평가하기 위한 방법의 기술되어있다. 본원에서 사용된 용어 "환자"는 임의의 온혈동물 바람직하게는 사람을 의미한다. 환자는 레슈마니아증(또는 기타 감염성 질환)또는 암과 같은 질환에로 걸렸거나, 또는 정상(즉, 검출가능한 질환 및 감염이 없음)일 수 있다. 일반적으로, 환자의 PBMC를 LbeIF4A 폴리펩타이드에 대해 노출시키는 경우 유도되는 증식성 또는 Th1-연관된 반응의 수준은 면역반응을 일으키는 환자의 능력의 징표이다.

<70> 요약하면, 면역 반응을 일으키는 환자의 능력 평가는, 본 발명의 폴리펩타이드와 감염된 또는 비감염된 환자로부터 수득된 PBMC를 접촉시키고, 세포의 적합한 반응을 측정함으로써 수행될 수 있다. 이러한 목적을 위한 PBMC를 예를 들어 Ficoll™(Winthrop Laboratories, New York)을 통한 밀도 원심분리를 포함하는 당업자에게 공지된 방법에 의해 단리될 수 있다. 일반적으로, 약 10^4 내지 10^6 세포를 평가하기에 충분한 폴리펩타이드의 양은 약 1㎍/㎖ 내지 약 500㎍/㎖, 바람직하게는 약 10㎍/㎖이다. PBMC와 폴리펩타이드의 항온처리는 통상적으로 37℃에서 약 5일 동안 수행된다. 폴리펩타이드와 항온처리한 후, PBMC을 적합한 반응에 대해 검정한다. 예를 들어, 측정된 반응은 방사성원소 표지된 티미딘의 펄스에 세포를 노출시키고 세포성 DNA내로의 표지의 삽입을 측정하는것과 같은 당업자에게 공지된 방법으로 평가될 수 있는 증식성 반응일 수 있다. 일반적으로, 자극 지수(즉, 항원으로 자극된 세포의 평균 cpm/항원이 없는 세포의 평균 cpm)가 5이상인 증식성 반응은 면역 반응을 일으키는 능력이 감소된 개체의 징표이다. 대안적으로, 측정된 반응은(폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)에 의한 증식을 포함할 수 있는) 당업자에게 공지된 기술에 의해 측정되는 상술된 바와 같은 하나 이상의 특이적 사이토킨(예: IFN-γ, IL-2, IL-12 p70, IL-12 p40 서브유닛, IL-1 및 TNF-α)의 분비 또는 하나 이상의 사이토킨(예: IFN-γ, IL-2, IL-12 p40 서브유닛, IL-1 및 TNF-α)를 암호화하는 mRNA의 수준일 수 있다. 이러한 사이토킨 분비 또는 mRNA 발현의 높은 수준은 면역 반응을 일으키는 우수한 능력에 상응한다. 일반적으로, 환자는 IL-12 또는 IL-12를 암호화하는 mRNA가 LbeIF4A 폴리펩타이드로 처리된 PBMC에서 (본원에서 기술된 방법에 의해) 측정될 수 없는 경우, 면역 반응을 일으킬 수 있는 능력이 저하된다.

<71> 추가의 면에서, 본 발명은 PBMC 및 단리된 성분 세포(이에 제한되지는 않으나, 대식구, 단핵세포, B 세포 및 수상돌기 세포)에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 이러한 세포의 자극을 위해, 세포를 당업자에게 공지된 임의의 다양한 기술(예: Ficoll-hypaque 밀도 원심분리)로 단리시키고 충분한 양 및 충분한 시간 동안 LbeIF4A 폴리펩타이드와 접촉시켜 상술된 바와 같은 면역 반응을 일으킬 수 있다. 본 발명에 따라 처리된 세포는 레슈마니아증 또는 기타 장애으로 고통받는 환자로부터 단리되고 치료후 환자내로 재주입될 수 있다. 레슈마니아-감염된 개체로부터 수득된 세포에 있어서, 생성될 수 있는 면역 반응은 우선적인 Th1 면역 반응(IL-12 생성의 자극을 포함함) 및 IL-10 발현의 하향조절을 포함한다. 감염되지 않은 개체로부터의 세포에 있어서, 면역 반응은 IL-12의 생성일 수 있다.

<72> 관련된 면에서, 본 발명은 사람을 포함하는 환자에서 면역 반응을 자극하거나 증강시키기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, LbeIF4A 폴리펩타이드는 상이한 항원에 대한 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 증강시키기 위한 면역조절제로서 사용될 수 있다. 상이한 특이적 항원과 함께, 환자에 LbeIF4A 폴리펩타이드를 투여함으로써, 항원에 대한 환자의 면역 반응이 증강될 수 있다. 이 면에서, LbeIF4A 폴리펩타이드는 항원과 동일한 제제(예: 백신)내에 투여될 수 있거나, 별개로 투여될 수 있다. 그러나, 일반적으로 항원 및 LbeIF4A 폴리펩타이드는 동일한 시간 및 부위에 투여된다. 이러한 방식으로, LbeIF4A 폴리펩타이드는, 예를 들어 이종성 제제를 위한 백신 제제중 보조제로서 사용될 수 있다. 적합한 투여 용량 및 투여 방법이 하기에 상세히 제시한다.

<73> 또한, LbeIF4A 폴리펩타이드를 단독으로 또는 기타 레슈마니아 항원과 함께 레슈마니아-감염된 개체에 투여하여, 레슈마니아 기생충에 결합된 항체의 생성을 자극할 수 있다. 사람 및 기타 포유동물에서 레슈마니아 종에 대한 합리적인 예측성으로 일반적으로 인식된 모델에서 LbeIF4A에 의한 마우스의 면역화는 백신으로서의 LbeIF4A 의 용도를 확인하는, 엘. 브라질렌시스에 대한 보호성 면역 반응을 일으킨다는 것이 밝혀졌다. 본 발명의 폴리펩타이드를, 예를들어 만성 피부 레슈마니아증로부터 고통받는 환자에 투여하여 치료적 면역 반응을 자극할 수 있다.

<74> 추가의 실시양태에서, 본원에서 기술된 폴리펩타이드를 환자에 투여하여 면역 반응을 일으킨다. 레슈마니아-감염된 개체에 있어서, 일어날 수 있는 면역 반응은 (IL-12 생성의 자극을 포함하는) 우선적인 Th1 면역 반응 및 IL-10 발현의 하향-조절을 포함한다. 감염되지 않은 개체에 있어서, 면역 반응은 IL-12 및/또는 IL-2의 생성 또는 감마 T 세포의 자극일 수 있다. 적합한 투여 용량 및 방법은 후술하는 바와 같다.

<75> 본 발명의 또 다른 면에서, 하나 이상의 LbeIF4A 폴리펩타이드를 인터루킨-12 자극에 반응성인 질환으로 고통받는 환자에 투여할 수 있다. 이러한 질환에는 감염(예를 들어 세균, 바이러스 또는 원생동물) 또는 암과 같은 질환이 포함된다. 일반적으로, IL-12 자극에 대한 특정 질환의 반응성은, 면역성의 임상학적 상호연관성에 대한 LbeIF4A 폴리펩타이드에 의한 처리 효과를 평가함으로써 측정된다. 예를 들어, 치료에 의해 치료된 환자에서 임상학적 개선과 함께 높아진 Th1 반응 또는 Th2의 Th1 프로파일로의 전환이 일어나는 경우, 질환은 IL-12 자극에 대해 반응성이다. 폴리펩타이드 투여는 후술되는 바와 같거나, 지시에 의존하여 장기간동안 지속될 수 있다.

<76> 상술된 면에서, LbeIF4A 폴리펩타이드가 환자에서 면역 반응을 자극하거나 증강시키기 위해 사용되는 경우, 폴리펩타이드는 바람직하게는 약제학적 조성물 또는 백신으로 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 생리학적으로 허용되는 담체 부형제 또는 희석제와 함께 하나 이상의 LbeIF4A 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수여체에게 무독성일 것이다. 백신은 하나 이상의 LbeIF4A 폴리펩타이드 및 증상에 따른 하나 이상의 추가의 적합한 항원을 포함한다. 가용성 사이

토킨 수용체 또는 사이토킨과 접합된 LbeIF4A 폴리펩타이드의 사용이 또한 고려된다.

<77> 투여 빈도수, 투여 경로 및 폴리펩타이드 투여량은 개체마다 다양화할 것이고, 최근 기타 감염의 면역화 또는 치료에서 사용되는 것과 병용될 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물 및 백신을 주사(예: 근육내, 정맥내 또는 피하내)로, 비강내(예: 흡입)로 또는 경구적으로 투여할 수 있다. 투여의 양 및 빈도수는 처리될 증상의 특성 및 중증도와 같은 인자, 목적 반응, 환자의 상태 등에 의존할 것이다. 통상적으로, 1 내지 4회 투여량이 2 내지 6주 동안 투여될 수 있다. 바람직하게는 2회, 즉 1회 투여 후 2 내지 4주째에 두 번째 투여한다. 적합한 투여량은 환자에서 IL-12의 생성을 자극하는 LbeIF4A 폴리펩타이드의 양이며, 예를 들면 환자로부터 분리된 PBMC의 상층액중 IL-12의 양이 약 10ng 내지 10μg/mL이다. 일반적으로, IL-12의 양은 본원에서 서술된 검정법을 포함하는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 검정법을 사용하여 측정할 수 있다. 투여량중 존재하는 LbeIF4A 폴리펩타이드의 양은 약 1pg 내지 약 100mg/숙주kg, 통상적으로 약 10pg 내지 약 1mg/숙주kg, 바람직하게는 약 100pg 내지 약 1μg/숙주kg의 범위이다. 적합한 투여량 범위는 동물의 크기에 따라 달라질 수 있으나, 통상적으로 10 내지 60kg 동물에 대해 약 0.01mL 내지 약 5mL 범위일 것이다. 특정 증상에 대한 특히 적합한 투여량은 용이하게 주정될 수 있다.

<78> 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체가 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있으며, 담체의 형태는 투여 방식에 의존할 것이고 서방성 투여가 바람직할 것이다. 피하주사와 같은 비경구 투여에 있어서, 담체는 바람직하게는 물, 염수, 알콜, 지방, 왁스 또는 완충액을 포함한다. 경구 투여에 있어서, 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로즈, 글루코즈, 슈크로즈 및 탄산마그네슘과 같은 고체 담체 또는 상술한 담체 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 생분해가능한 소구체(예: 폴리락틱 갈락티드)은 본 발명의 약제학적 조성물을 위한 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 생분해가능한 소구체는 문헌[참조: 미국특허번호 제4,897,268호 및 제5,075,109호]에서 기술된다.

<79> 약제학적 조성물 및 백신은 또한 완충액과 같은 희석제, 아스코르브산과 같은 항산화제, 저분자량(약 10개 이하의 잔기) 폴리펩타이드, 단백질, 아미노산: 글루코즈, 슈크로즈 또는 덱스트린을 포함하는 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트제, 글루타티온 및 기타 안정화제 및 부형제를 함유할 수 있다. 중성의 완충된 염수 또는 비특이적 혈청 알부민과 혼합된 염수가 적합한 희석제로 예시된다. 바람직하게는, 생성물을 희석제와 같은 적합한 부형제 용액(예: 수크로즈)를 사용하여 동결 건조체로서 제형화할 수 있다.

<80> 비특이적으로 면역 반응을 증강시키기 위해, LbeIF4A 폴리펩타이드외에 임의의 다양한 보조제를 본 발명의 약제학적 조성물 또는 백신에 사용할 수 있다. 대부분의 보조제는 알루미늄 하이드록사이드 또는 무기 오일과 같은 신속한 이화작용으로부터의 항원 및 지질 진아 A, 보르델라 퍼투시쓰(Bordella pertussis) 또는 미코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)와 같은 면역 반응의 비특이적 자극제를 보호하도록 고안된 물질을 함유한다. 이러한 보조제는 예를 들어 프로인트 불완전 보조제 및 완전 보조제(Difco Laboratories, Detroit, MI) 및 머크 보조제 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ)로서 시판된다.

<81> 본 발명의 또 다른 한 면으로, 보호성 면역 반응을 자극하는 주어진 항원의 능력을 측정하는 방법을 제공한다. 인터루킨-12 생성을 자극하는 LbeIF4A의 능력은 감염된 환자에서 보호성, Th1 반응의 발달 및 감염된 환자로부터 분리된 PBMC의 발달과 상호연관되어 있다. 그러므로, 선별된 항원이 IL-12, IFN-γ 및/또는 IL-2 생성을 자극할 수 있는지 여부를 판단하여 백신 개발에 사용하기 위한 신속한, 재생가능한 스크리닝 방법을 제공한다. 상술된 방법을 사용하여 정상적인 말초 혈액 단핵 세포에서 감마 T 세포, IL-12 및/또는 IL-2 생성의 자극에 의해 증명되는 바와 같이 Th1 반응을 유도할 수 있는 항원이 일반적으로 백신의 제조에 있어서 적합하다.

<82> LbeIF4A 단백질 유도체는 또한 면역검정에서 면역원, 시약으로 사용될 수 있거나 진화 정제 방법에 있어서 결합제로서 사용될 수 있다. 검정 또는 정제 목적을 위한 LbeIF4A 폴리펩타이드는 고체 지지체에 결합될 수 있다. 폴리펩타이드를 특허 및 과학 문헌에 서술된 충분히 당업자에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 지지체상에 결합될 수 있다. 본 발명의 명세서에서, 용어 "결합된"은 흡착과 같이 비공유적 결합 및 공유적 부착(항원과 지지체상 작용 그룹간에 직접적으로 연결될 수 있거나 가교-연결제에 의해 연결될 수 있음)을 의미한다. 미세역가 플레이트중의 웰 또는 막에 흡착됨으로써 결합하는 것이 바람직하다. 이러한 경우에 적합한 완충액중 폴리펩타이드를 적합한 시간동안 고체 지지체와 접촉시킴으로써 흡착시킬 수 있다. 접촉 시간은 온도에 따라 변하나, 통상적으로 약 1시간 내지 1일이다. 일반적으로, 플라스틱 미세역가 플레이트(폴리스티렌 또는 폴리비닐클로라이드)의 웰을 약 10ng 내지 약 1μg, 바람직하게 약 250ng의 폴리펩타이드와 접촉시키는 것이 적합한 양의 항원이 결합하기에 충분하다.

<83> 폴리펩타이드는 다양한 기술을 사용하여 고체 지지체에 공유적으로 결합될 수 있다. 예를 들어 M-말레이미도벤조일 석신이미드 에스테르 및 N-하이드록시석신이미드와 같은 시스테인 및 라이신 잔기에 폴리펩타이드를 공유적으로 결합시킬 수 있는 가교-결합제를 사용하여 결합시킬 수 있다. LbeIF4A 폴리펩타이드는 또한 시아노겐 브로마이드-활성화된, 비속시란-활성화된, 카보닐디이미다졸-활성화된 또는 토실-활성화된 아가로즈 구조와 같은 다양한 불용성 기질에 반응성 측쇄 그룹을 통해 공유적으로 결합될 수 있거나 (글루타르알데히드 가교-결합을 갖거나 갖지 않는) 폴리올레핀 표면에 흡착시킴으로써 결합시킬 수 있다.

<84> 일반 기질에 결합되면, LbeIF4A 폴리펩타이드는 LbeIF4A 단백질을 결합하는 항체에 대한 검정법에서 사용될 수 있다. 적합한 검정법은 효소 연결된 면역흡착제 검정법(ELISA)을 포함한다. 이러한 검정법은 고체 지지체, 통상적으로 미세역가 플레이트상에 고정된 폴리펩타이드 항원을 샘플중 폴리펩타이드에 대한 항체가 고정화된 폴리펩타이드에 결합하도록 항체-함유 샘플과 우선 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 결합하지 않은 샘플을 고정화된 폴리펩타이드로부터 제거하고 고정화된 항체-폴리펩타이드 복합체에 결합할 수 있는 검출 시약을 첨가한다. 고체 지지체에 결합되어 잔류하는 검출 시약의 양은 특이적 검출 시약에 적합한 방법을 사용하여 측정한다.

<85> 고정화된 폴리펩타이드를 LbeIF4A 폴리펩타이드에 결합하는 항체를 정제하기 위해 사용할 수 있다. 이러한 항체를 당업자에게 공지된 임의의 다양한 기술에 의해 제조할 수 있다[참조: Harlow and

Land, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]. 이러한 기술중 하나에서, 폴리펩타이드를 포함하는 면역원을 임의의 광범위하게 다양한 포유동물(예: 마우스, 랫트, 토끼, 양 및 염소)내로 초기에 주입한다. 이 단계에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 변형 없이 면역원으로서 역할을 할 수 있다. 대안적으로, 상대적으로 단쇄의 폴리펩타이드에 있어서, 우수한 면역 반응이 폴리펩타이드가 소 혈청 알부민 또는 키홀 림펫(keyhole limpet) 헤모시아닌과 같은 담체 단백질과 연결시키는 경우 유도될 수 있다. 면역원을 바람직하게는 1회 이상의 부스터(booster) 면역화를 포함하는 예정된 스케줄에 따라 동물 숙주내로 주입하고 동물을 주기적으로 출혈시킨다. 폴리펩타이드에 대해 특이적인 폴리클로날 항체는 예를 들어 적합한 고체 지지체에 커플링된 폴리펩타이드를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 항혈청으로부터 정제될 것이다.

<86> 대상 폴리펩타이드에 대해 특이적인 모노클로날 항체는 예를 들어 문헌[참조: Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976]의 기술 및 이의 개선책을 사용하여 제조할 수 있다. 요약하면, 이들 방법은 바람직한 특이성(즉, 대상 폴리펩타이드와의 반응성)을 갖는 항체를 생성할 수 있는 불멸 세포주의 제조를 포함한다. 이러한 세포주는 예를 들어 상술된 바와 같이 면역화된 동물로부터 수득된 비장 세포로부터 생성될 수 있다. 비장 세포를 예를 들어 골수종 세포 융합 파트너, 바람직하게는 면역화된 동물로 상승작용된 것과 융합시킴으로써 불멸화된다. 다양한 융합 기술이 사용될 수 있다. 예를 들어 비장 세포 및 골수종 세포를 수분동안 비이온성 세제와 배합할 수 있고, 골수종 세포가 아닌 하이브리드 세포의 성장을 지지하는 선별 배지상에 저밀도로 플레이팅한다. 바람직한 선별 기술은 HAT(하이포크산틴, 아미노프테린, 티미딘) 선별을 사용한다. 대개 약 1 내지 2 주간의 충분한 시간 후, 하이브리드 콜로니가 관찰된다. 단일 콜로니를 선별하고 폴리펩타이드에 대한 결합 활성에 대해 시험한다. 반응성 및 특이성이 높은 하이브리도마가 바람직하다.

<87> 모노클로날 항체를 성장하는 하이브리도마 콜로니의 상층액으로부터 분리할 수 있다. 또한, 마우스와 같은 적합한 척추동물 숙주의 복강내로의 하이브리도마 세포주의 주입과 같은 다양한 기술이 수율을 증강시키기 위해 사용할 수 있다. 모노클로날 항체를 복수 체액 또는 혈액으로부터 수거할 수 있다. 오염물을 크로마토그래피, 겔 여과, 침전 및 추출과 같은 통상적인 기술로 항체로부터 제거할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는 정제 방법, 예를 들어 친화성 크로마토그래피 단계에서 사용될 수 있다.

<88> 본 발명의 폴리펩타이드에 결합하는 단일특이적 항체를 예를 들어 직접적이거나 경쟁적일 수 있는 다양한 면역검정법중 하나를 사용하여 생물학적 샘플중 레슈마니아 감염을 측정하기 위해 사용할 수 있다. 요약하면, 직접적인 검정 포맷에서 단일특이적 항체는 고체 지지체(상술된 바와 같은)상에 고정화되고 시험될 샘플과 접촉될 수 있다. 결합되지 않은 샘플을 제거한 후, 리포터 그룹으로 표지된 두 번째 단일특이적 항체를 첨가하여 결합된 항원을 검출하는데 사용할 수 있다. 예시적인 경쟁 검정법에서, 샘플은 적합한 리포터 그룹으로 표지된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체와 배합될 수 있다. 샘플 및 항체의 혼합물은 적합한 고체 지지체상에 고정화된 폴리펩타이드 항원과 결합될 수 있다. 샘플중 항원에 결합되지 않은 항체가 고정화된 항원에 결합하고 샘플 및 항체 잔여물을 제거한다. 고체 지지체상에 결합된 항체의 수준은 샘플중 항원의 수준과 역의 관계가 있다. 그러므로, 고체 지지체상에 결합된 저농도의 항체는 샘플중 레슈마니아 존재를 나타낸다. 샘플중 레슈마니아를 측정하는 단일특이적 항체를 사용하기 위한 기타 포맷은 당업자에게 분명할 것이고 상술한 포맷은 예시적인 목적에만 제공된다.

<89> 하기 실시예를 예시하여 제공하나 제한하려는 것은 아니다. 당업자는 실시예에 포함된 본 발명의 변이체를 본원에서 인용된 다양한 참조문헌의 지침에 비추여 제조할 수 있다.

실시예

<90> 실시예 1

<91> LbeIF4A를 암호화하는 DNA의 제조

<92> 본 실시예는 엘.브라질렌시스 라이보좀 항원 LbeIF4A를 암호화하는 DNA 서열의 분자생물학적 클로닝을 예시한다.

<93> 게놈성 발현 라이브러리를 박테리오파아지 λZAPII(Stratagene, La Jolla, CA)중 엘.브라질렌시스(MHOM/BR/75/M2903)로부터의 등분된 DNA로 작제된다. 발현 라이브러리를 점막성 레슈마니아증의 엘.레슈마니아-감염된 개체로부터 이.콜라이-예비흡착된 환자 혈청으로 스크리닝한다. 면역반응성 재조합 항원을 함유하는 플라크를 정제하고, 제조자의 프로토콜을 사용하여 pBSK(-) 파아지미드를 절단한다. 단일쇄 주형 제제에 대한 중첩 결실을 엑소뉴클리아제 III으로 수행하여 서열화한다. 단일쇄 주형을 제조자(Stratagene, La Jolla, CA)가 추천한 VCSM13 헬퍼 파아지로 감염후 단리하고 디데옥시 쇄 터미네이터 방법에 의해 또는 어플라이드 바이오시스템 오토메이티드의 서열화기 모델 373A을 사용하여 Taq 염료 터미네이터 시스템으로 서열화한다.

<94> 면역반응성 재조합 항원을 하기 실시예 5에서 설명한 바와 같이, 증식성 반응 및 하기 실시예 7에서 서술된 바와 같이, 탁월한 Th1 사이토킨 프로파일을 자극하는 능력에 대해 T 세포 검정법으로 환자에서 분석한다.

<95> 예측되는 아미노산 서열과 기타 단백질의 서열을 서열 비교한 후, 진핵세포 개시인자 4A(eIF4A)의 레슈마니아 브라질렌시스 동족체로서 확인되는 재조합 클론을 상기 검정법으로 확인한다. 단리된 클론(pLeIF.1)은 전체 길이의 단백질 서열중 처음 48개의 아미노산 잔기(144개의 뉴클레오타이드)가 부족하다. pLeIF.1 삽입체는 후속적으로 전체 길이 게놈성 서열을 단리하기 위해 사용된다.

<96> 서열확인번호: 1은 전체 길이의 LbeIF4A 폴리펩타이드의 전체 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. 오픈 판독 프래임(뉴클레오타이드 115번 내지 1323번)은 예측된 분자량이 45.3kD인 403개의 아미노산 단백질을 암호화한다. LbeIF4A의 예측된 단백질 서열과 담배(TeIF4A), 마우스(MeIF4A) 및 효모(YeIF4A)로부터의 유사 단백질의 서열을 비교하면 가장 가변적인 처음 20 내지 30개의 아미노산이 광범위한 서열 유사성을 보여준다. 각각 길이가 403, 413, 407 및 395개의 아미노산이고 분자량이 45.3, 46.8, 46.4 및 44.7kDa이며 등전위점이 5.9, 5.4, 5.5 및 4.9인 LbeIF4A, TeIFA4, MeIF4A 및 YeIF4A가 유사하다.

LbeIF4A는 TeIF4A와 75.5%의 전제 유사성(57%의 동일성, 18.5%의 보존적인 치환)을 보이고, MeIF4A와 68.6%의 유사성(50%의 동일성, 18.6%의 보존적인 치환)을 보이며, YeIF4A와 67.2%의 유사성(47.6%의 동일성 19.6%의 보존적인 치환)을 보인다.

<97> 실시예 2

<98> LbeIF4A 유전자의 특성화

<99> 본 실시예는 레슈마니아 종중 LbeIF4A DNA의 서던 블롯 분석을 서술한다. 레슈마니아 브라질렌시스(MHOM/BR/75/92903), 엘. 구아넨시스(L. guyanensis, MHOM/BR/75/M4147), 엘. 아마조넨시스(L. amazonensis, IFLA/BR/67/PH8), 엘. 카가시(L. chagasi, MHOM/BR/82/BA-2.CI 및 MHOM/BR/84/Jonas), 엘. 도노바니(L. donovani. MHOM/Et/67/HU3), 엘. 메이저(L. major, LTM p-2), 엘. 트로피카(L. tropica, 1063C), 트리파노조마 크루지(Trypanosoma cruzi, MHOM/CH/00/Tulahuen C2) 및 티. 브루세이(T. brucei, TREU 667)가 사용되었고 이미 서술되었다[참조: Burns et al., Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 775-779, 1993]. 무균성 배지중 프로마스티고트(promastigote) 및 에피마스티고트(epimastigote)를 배양한다. 엘. 카가시 및 엘. 아마조넨시스 아마스티고트(amastigote)를 시리아산 햄스터의 비장 및 BALB/c Byl 마우스의 각부(footpad)로부터 각각 수득하고 문헌[참조: Burns et al., J. Immunol. 146: 742-748, 1991]에 서술된 바와 같이 정제한다.

<100> 게놈성 DNA를 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989]에 서술된 바와 같이, (PstI 및 NotI)내 및 LbeIF4A의 외부를 절단하는 효소(BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PvuII 및 SstI) 절단하고, 0.7% 아가로즈 겔상에 분리하고 니트란 막상에 블롯팅한다. LbeIF4A의 암호 영역중 약 0.94kb 단편(143번 내지 1083번 뉴클레오타이드)을 포함하는 제한 단편을 랜덤 플라이밍 방법[참조: Feinberg and Vogelstein, Anal. Biochem, 137: 266-268, 1984]으로 방사능 원소표지하고 블롯을 65℃에서 밤새 하이브리드화한다. 블롯을 0.1% SDS를 함유하는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC로 각각 20분동안 2회 세척한다. 엘. 브라질렌시스 게놈성 DNA는 BamHI 및 PvuII 레인(도 1)에서 두 개의 하이브리드화 밴드의 존재에 의해 예시되는 바와 같은 2개 이상의 복사체를 함유한다.

<101> 도 1은 엘. 블라질렌시스와 기타 레슈마니아 종간의 eIF4A 상동성의 가교-종 보존성을 도시한다. 2개의 주된 PstI 하이브리드화 단편을 동일한 하이브리드화 패턴을 보여주는 엘. 도노바니 복합체(엘. 카가시, 엘. 도노바니 및 엘. 인판툼(L. infantum))의 막으로 시험된 모든 기타 레슈마니아 종에서 측정된다. LbeIF4A은 엄격한 하이브리드화 조건하에서 또한 티. 브루세이가 아닌 더욱 분명하게 연관된 기생충 티. 크루지로 가교-하이브리드화된다. 이 자료는 레슈마니아 eIF4A 상동성의 광범위한 가교-종 보존성을 보여준다.

<102> 실시예 3

<103> LbeIF4A의 제조

<104> 본 실시예는 약 45kDa의 LbeIF4A 항원 유전자 생성물의 발현 및 정제를 예시한다. 게놈성 클론의 45kDa 재조합 항원 pLeIF.1(즉, N-말단 48개의 잔기가 부족한 항원)을 IPTG-유도 배양액 500ml로부터 정제한다. 삽입체를 단리하고 후속적으로 2, 4 및 8M 우레아를 함유하는 TNE(50mM 트리스, pH8.0, 100mM NaCl 및 10mM EDTA)중에서 세척한다. 용해된 재조합 항원을 함유하는 분획(통상적으로 4 및 8M 우레아 상층액)을 모으고, 트리스-완충된 염수(PBS)로 투석하고 30% 암모니움 설페이트로 침전시킴으로써 농축시킨다. 예비 SDS-PAGE 전기영동, 재조합 항원의 절단 및 전기 용출에 의해 균질하게 정제된다. 본 연구에서 사용된 모든 항원은 임무넥스 코포레이션(Immunex Corp., Seattle, WA)에 의해 수행되는 리물루스(Limulus) 변형세포 검정법에서 10pg/ml 미만의 내독소를 갖는다.

<105> 재조합 항원을 사용하여 폴리클로날 항-혈청의 생산을 위해 토끼를 면역화시킨다. 성체 토끼(New Zealand White; R & R Rabbitry, Stanwood, WA)를 무라밀 디펩티드(보조제 펩티드, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) 100㎍과 함께 불완전 프로인트 보조제(IFA, GIBCO, Grand Island, NY)중 정제된 LbeIF4A 100㎍으로 피하 면역화로 면역화시키 IFA만으로 재조합 항원 100㎍으로 4주후 부스터시킨다. 3주후, 토끼를 염수중 LbeIF4A 25㎍으로 정맥내로 부스터시키고 혈청을 1주후 수집한다.

<106> 초기-, 중기- 또는 말기-단계동안 또는 22 내지 35℃로부터의 배양물의 온도 전이 후 수거된 프로마스티고트로부터 엘. 블라질렌시스 용균물의 면역블롯을 후속적으로 프로브로서 폴리클로날 토끼 항-혈청으로 수행한다(도 2). 도 2의 패널 A는 분자량 마커(레인 M), 유도되지 않은(레인 1) 및 유도된(레인 2) 배양물로부터의 이,콜라이 용균물 및 정제된 재조합 항원(레인 3)의 면역블롯 분석을 보여준다. 도 2의 패널 B를 엘. 브라질렌시스 프로마스티고트 용균물(레인 1), 엘. 카가시 프로마스티고트 용균물(레인 2) 및 엘. 아마조넨시스 프로마스티고트(레인 3) 또는 아마스티고트(레인 4) 용균물의 면역블롯 검정을 보여준다.

<107> 기생충 및 포유동물 세포 용균물을 글리세롤 및 β-머캅토에탄올이 없는 SDS샘플 완충액중 펠렛의 용해물을 동결/해동시킴으로써 제조한다. 불용성 물질을 마크로푸지(microfuge)중 10K rpm에서 원심분리에 의해 상층액으로부터 분리한다. 단백질 농도를 Pierce BCA 단백질 검정 키트를 사용하여 측정한다. 기생충 또는 세포 추출물 5 내지 10㎍ 또는 재조합 항원 0.5 내지 1.0㎍를 12.5% SDS-PAGE상에 분리하고 니트로셀룰로즈 막에 전기영동적으로 이동시킨다. 항혈청의 반응성을 [^{125}I]-단백질 A를 사용하여 문헌[참조: Skeiky et al., J. Exp. Med. 176 201-211, 1992]에 서술된 바와 같이 평가하고, 자동방사능사진술에 의해 평가한다.

<108> 토끼 항-혈청은 약 45kD의 한 주된 단백질 종을 측정한다. 45kD eIF4A 동족체의 상대적인 강도는 분석될 모든 용균물에 있어서 유사하고, 이는 이 항원이 기생충이 초기- 내지 중기-단계 성장 단계 동안 또는 세포내 아마스티고트 상태를 모방하는 온도전이후 구성적으로 발현하는 것을 제안한다. 이는 생성물이 22 내지 35℃로부터의 온도 전이후 상향조절되는 레슈마니아 가열-쇼크 단백질 족의 막과 유사하지 않다. 예비-면역 토끼 혈청은 기생충 용균물과 반응하지 않는다.

<109> 실시예 4

<110> LbeIF4A에 결합하는 모노클로날 항체의 제조

<111> 본 실시예는 LbeIF4A에 대한 모노클로날 항체의 제조를 예시한다. 정제된 재조합 LbeIF4A 또는 높은 수준의 LbeIF4A를 발현하는 형질전환된 세포의 제조를 미국특허번호 제4,411,993호에서 서술된 바와 같은 통상적인 기술을 사용하여 LbeIF4A에 대한 모노클로날 항체를 생성하는데 사용할 수 있다. 이러한 항체는 LbeIF4A에 대한 진단학적 또는 연구 검정의 성분으로서 또는 LbeIF4A의 친화 정제에서 PBMC의 LbeIF4A의 활성화를 방해하기 위해 사용될 수 있다.

<112> 설치류를 면역화하기 위해, LbeIF4A 면역원은 보조제(완전 또는 불완전 프로인트 보조제, 알룸, 또는 Ribi 보조제 700(Ribi, Hamilton, MT))와 같은 보조제중에 유화시키고 선택된 설치류, 예를 들어 BALB/c 마우스 또는 루이스 랫트내로 피하내로 10 내지 100μg 범위의 양으로 주사한다. 10일 내지 3주후, 면역화된 동물을 추가의 면역원으로 부스터시키고 주기적으로 주당, 이주당 또는 매 삼주당 면역화 스케쥴에 따라 이후 부스터시킨다. 혈청 샘플을 주기적으로 돗-블롯(dot-blot)검정(항체 샌드위치) 또는 ELISA(효소-연결된 면역흡착체 검정)에 의한 시험을 위한 레트로-오비탈 출혈 또는 꼬리-말단 절단에 의해 취한다. Th1 반응의 유도를 억제하는 것과 같은 기타 검정 방법이 또한 적합하다.

<113> 적합한 항체 역가의 검출 후, 양성 동물에 염수중 항원의 정맥내 주사를 가한다. 3 내지 4일 후, 동물을 절명시키고, 비세포를 수거하고 쥐 골수종 세포주(예: NS1 또는 바람직하게는 Ag 8.653[ATCC CRL 1580])와 융합시킨다. 이 방법에 의해 생성된 하이브리도마 세포주는 선택적 배지(예: 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 또는 HAT)중의 다양한 미세역가 플레이트에 플레이트하여 비융합된 세포, 골수종-골수종 하이브리드 및 비세포-비세포 하이브리드의 증식을 억제한다.

<114> 그러므로, 생성된 하이브리도마 주를 예를 들어 문헌[참조: Engvall et al., Immunochem. 8; 871(1971) 및 미국특허번호 제4,703,004호]에 기술된 기술을 적용하여 LbeIF4A과의 반응성에 대해 ELISA로 스크리닝한다. 바람직한 스크리닝 기술은 문헌[참조: Beckman et al., J. Immunol, 144; 4212(1990)]에 의해 서술된 항체 포획 기술이다. 하이브리도마 주는 예를 들어 희석을 제한하거나 연성 아가에서 클로닝하는 방법으로 클로닝하여 모노클로날 세포주를 수득한다. 양성 클론을 동계(syngenic)의 설치류의 복강내로 주사하여 고농도(>1mg/ml)의 항-LbeIF4A 모노클로날 항체를 함유하는 복수를 생성한다. 생성되는 모노클로날 항체를 항산암모니움 침전 후 겔 배제 크로마토그래피로 정제할 수 있다. 대안적으로, LbeIF4A에의 결합에 기초한 친화성 크로마토그래피할 수 있는 바와 같이, 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 항체의 결합을 기초로 하는 친화성 크로마토그래피를 사용할 수 있다.

<115> 실시예 5

<116> PBMC 증식의 LbeIF4A 자극

<117> 본 실시예는 엘. 브라질렌시스-감염된 개체로부터 PBMC의 증식을 자극하는 정제된 재조합 LbeIF4A의 능력을 예시한다. 말초 혈액을 10년에 걸쳐 수행되는 풍토병적, 임상학적 및 면역학적 연구가 수행된 엘. 브라질렌시스 전이에 대한 풍토병 지역(Corte de Pedra, Bahia, Brazil)에서 살아있는 개체로부터 수득된다. 환자를 병소로부터의 기생충의 분리, 레슈마니아 용균물로의 양성 피부 시험 또는 양성 혈청학적 시험중 하나 이상과 연관된 임상학적 발견에 의해 진단한다.

<118> 말초 혈액을 수집하고 PBMC를 Ficoil™(Winthrop Laboratories, New York)을 통해 밀도 원심분리함으로써 분리한다. 시험관내 증식 검정에 있어서, 2 내지 $4x10^5$ 세포/웰을 지시된 항원 10μg/ml 또는 PHA(Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) 5μg/ml가 있거나 없는 96-웰 편저 플레이트중의 완전 배지(젠타마이신, 2-ME, L-글루타민 및 10% 스크리닝된 푸울링된 A+ 사람 혈청으로 보충된 RPMI 1640; Trimar. Hollywood, CA)에서 5일동안 배양한다. 세포를 배양 최종 18시간동안 [^{3}H] 티미딘 1μCi로 펄스한다.

<119> 자료를 세 개의 동일한 배양물의 평균 cpm로서 나타나고 자극 지수(SI)는 항원이 있는 배양물의 평균 cpm/항원이 없는 배양물의 평균 cpm으로서 정의된다. 표 1 및 도 3에서 보이는 바와 같이, 대부분(>70%)의 점막성 및 활성 또는 치유된 피부 환자로부터의 PBMC는 자극 지수가 각각 12 내지 233 및 2 내지 64인 이종성 증식 패턴을 갖는 LbeIF4A와 반응한다.

<120> [표 1]

<121> 기생충 용균물 및 LbeIF4A 항원에 대한 반응에서 엘. 브라질렌시스-감염된 개체로부터의 PBMC의 시험관내 증식성

[^{3}H]Tdr 삽입(평균 cpm (SD) × 10^3)					
환자	매체	용균물		LbeIF4A	
			SI		SI
점막성					
JV	0.15(0.0)	41.30(1.3)	294	11.90(4.8)	81
SZ	0.45(0.1)	140.60(7.6)	308	105.90(5.6)	233
AB	0.42(0.3)	44.20(0.5)	104	5.00(1.3)	12
NO	0.38(0.1)	52.70(3.3)	138	12.80(1.6)	33
TE	0.18(0.0)	27.40(1.5)	150	8.80(0.3)	48
MB	0.18(0.0)	300.10(9.4)	1634	41.50(4.5)	226
OM	0.28(0.0)	35.40(3.2)	124	6.90(2.5)	24
피부					
AS	0.22(0.0)	19.14(1.3)	87	14.30(2.3)	64
JP	0.25(0.0)	55.63(8.6)	218	4.40(0.3)	17
VS	0.17(0.0)	0.26(0.0)	1.5	0.3(0.0)	2
RJ	0.10(0.0)	0.32(0.2)	3.0	1.5(0.6)	15
JA	0.16(0.0)	0.77(0.1)	4.7	2.5(0.2)	16
AD	4.20(1.0)	4.01(1.0)	2.0	14.1(2.2)	3.5
HN	0.36(0.0)	4.73(1.7)	13	4.69(1.7)	13
범발성 피부					
VAL	0.22(0.0)	0.51(0.3)	2.0	2.12(0.2)	9.0
자가-치유 피부					
GS	0.21(0.0)	19.70(4.4)	94	41.50(2.8)	198
MS	0.09(0.0)	0.60(0.1)	6.5	5.10(2.1)	57
AH	0.11(0.0)	59.60(7.1)	519	9.60(4.7)	83
DJ	0.12(0.0)	0.20(0.1)	1.6	19.00(6.7)	151
HS	0.12(0.0)	27.10(2.0)	225	12.40(2.7)	103
MCT	0.38(0.0)	130.30(14)	340	6.20(1.5)	16
정상					
LV	0.14(0.0)	0.19(0.0)	1.4	0.71(0.1)	4.0
VV	0.18(0.0)	0.31(010)	1.7	0.28(0.1)	1.5
N3	0.14(0.0)	0.36(0.1)	2.6	0.27(0.1)	1.9
N4	0.59(0.1)	2.00(0.3)	3.8	0.56(0.0)	1.0

<123> 일반적으로, 자극 지수는 점막성 개체로부터의 PBMC에서 더욱 높다. 동일한 점막성 환자로부터의 PBMC는 기생충 용균물로 관찰된 것과 비교가능한 자극 지수로 LbeIF4A와 반응한다. 흥미롭게도, 피부 레슈마니아증의 몇몇 환자에서, LbeIF4A에 대한 증식성 반응은 기생충 용균물로 유도된 것보다 더욱 높다. 점막성 및 피부 환자와 대조적으로, 자가 치유 피하 레슈마니아증 개체 6명으로부터의 PBMC는 점막성 개체의 것과 비교하여 자극 지수가 16 내지 198인 LbeIF4A에 반응하여 증식한다. 자가 치유 개체 2명으로부터의 PBMC(MS 및 DJ)는 기생충 용균물로 수득된 것 보다 상당히 높게 반응한다. 정상적인 감염되지 않은 개체로부터의 세포는 LbeIF4A에 의해서 단지 약간 자극된다.

<124> 실시예 6

<125> PBMC에서 사이토킨 mRNA 벌현의 LbeIF4A 자극

<126> 본 실시예는 확인된 엘. 브라질렌시스 감염 환자로부터의 PBMC의 사이토킨 mRNA 발현 패턴에 대한 분석을 나타낸다. 사이토킨 mRNA에 있어서, PBMC 0.5 내지 1ml를 서열확인번호: 2(실시예 3에서 서술된 바와 같음)의 N-말단 48개의 잔기가 부족한 LbeIF4A 항원 10μg/ml가 있는 또는 없는 1 내지 2x10^6세포/ml에서 48 및 72시간 동안 배양한다. 상층액 및 세포를 수거하고 사이토킨 mRNA에 대해 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)으로 분석한다. 사이토킨 mRNA PCR 분석에 있어서, 총 RNA를 문헌[참조: Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem. 162: 156-159, 1987]에서 서술된 바와 같이, 산 구아니디움 티오시아네이트-페놀-클로로포름 추출 방법을 사용하여 PBMC로부터 단리한다. 상보적인 DNA(cDNA)를 20μℓ의 최종 용적중에서 폴리(dT)(Pharmacia) 및 AMV 역전사효소(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD)를 사용하여 합성한다. cDNA 샘플을 물로 200μℓ이 되게한다.

<127> β-액틴에 대한 정상화후, 희석된 cDNA 12 내지 20μℓ를 50μℓ의 반응 용적중 각각 0.2 μM 5' 및 3' 외부 프라이머 및 Taq 폴리머라제(Perkin- Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 사용하는 PCR로 증폭시킨다. (β-액틴, IL-2 및 IL-4에 대하여 1분동안: IL-10에 대하여 30초 동안) 94℃에서 변성, (β-액틴, IL-2 및 IL-4에 대하여 1분동안: IL-10에 대하여 30초 동안) 55℃에서 어닐링 또는 (IFN-γ에 대하여 45초 동안) 60℃에서 어닐링 및 72℃에서 연결하는 조건이 사용된다. 이러한 PCR 조건은 cDNA의 연속적인

희석을 초기에 수행하고 PCR에 대해 사용되는 주기의 수를 변화시킴으로써 반정량 범위내임을 증명한다. 모든 후속적인 실험에서, 30주기가 β액틴, IL-2, IL-4 및 IFN-γ에 대한 증식 반응에서 사용된다. IL-10 PCR의 경우에, 25주기가 사용된다.

<128> 사용된 프라이머 쌍 및 PCR 조건을 공개된 정보; β-액틴, IL-2, IL-4 및 IFN-γ[참조: Ehlers et al., J. Exp. Med. 173: 23-36, 1991] 및 IL-10[참조: Viera et al., Proc. Matl. Acad. Sci. U.S.A 88: 1172-1176, 1991]로부터의 것이다. 5' 및 3' 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 대한 뉴클레오타이드 서열은 하기

와 같다: (1)β-액틴, TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA 및

CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG; (2)IL-2, ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT . 및

GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC, (3)IL-4, ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT 및

CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT; (4)IFN-γ, ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT 및

GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT; 및 (5)IL-10, TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA 및

ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA이다.

<130> 프로브는 HindIII/EcoRI, EcoRI, SacI/HindIII 및 EcoRI으로 각각 절단되는 사람 서열 IL-2, IFN-γ 및 IL-4[참조: Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85: 9743-9747, 1988] 및 β-액틴(no. 65128; American Type Culture Collection, Rockville, MD)을 함유하는 플라스미드를 사용하여 수득된다. 사람 IL-10 cDNA를 사람 IL-10의 전체 암호화 영역을 갖는 535개의 염기쌍 단편을 증식하도록 고안된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 정상적인 공여체로부터 유사분열물질-자극된 PBMC로부터 PCR로 클로닝한다[참조: Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 9743-9747, 1988]. cDNA를 pBluescript내로 서브클로닝하고 BamHI/EcoRI으로 절단한다. 1% 아가로즈 겔상에서 분리후, 삽입체 DNA 단편을 절단하고, 전기용출하고, 정제한다. 방사성원소표지된 ^{32}P-프로브를 랜덤 프라이밍 방법에 의해 제조된다.

<131> PCR 생성물을 1.5% 아가로즈 겔상에서 전기영동하고, 나일론 막에 전이시키고 적합한 32P-표지된 DNA 삽입체로 프로브화함으로써 분석한다. 55℃에서 밤새 하이브리드시킨다. 하이브리드화 후 55℃에서 0.2% SDS를 함유하는 2x 및 1xSSC로 각각 2회, 20분동안 세척한다.

<132> 이러한 분석의 결과를 도 4a 및 4b에 제시한다. PCR 사이토킨 분석을 배양에 앞서(레인 0) 세포와 수행하고, 항원의 부재하에서(레인 -) 배양하거나 엘. 브라질렌시스 용균물 10μg/ml(레인 Lb)의 존재하에서 또는 LbeIF4A 10μg/ml(레인 IF)의 존재하에서 배양하여 수행한다. 도 4a는 범발성 피부 레슈마니아증(DCL)에서 명백해지듯이 분석된 6명의 점막성 환자 PBMC 3명(JV, SZ 및 TE) 및 엘.아마조넨시스 감염 환자(VA)에 있어서 사이토킨 mRNA의 PCR 결과를 보여준다. 6명의 점막성 환자의 3명에서(TE, 도 4a; NO 및 EO, 보이지않음), 시험관내에서 배양되지 않은 PBMC를 IFN-γ 및 IL-4, 및 IL-2(환자 TE 및 EO)에 대한 mRNA의 측정가능한 농도이다. IL-10 mRNA는 임의의 점막성 환자에서 "휴지" PBMC에서 측정되지 않는다. 그러나, 항원 자극 없이 시험관내 배양한 후, IL-10 mRNA의 합성은 분석된 대부분의 점막성 PBMC에서 상향조절된다. 또한, 환자 TE, NO 및 EO의 "휴지" PBMC에서 측정된 사이토킨 mRNA의 농도는 백그라운드 수준까지 감소한다.

<133> 기생충 용균물은 (6명의 환자의 3명에서) Th1 사이토킨 IFN-γ 및 IL-2의 mRNA 발현 및 Th2 사이토킨 IL-4의 mRNA 발현을 자극한다. 증가된 IL-10 mRNA을 환자의 PBMC(SZ)중 한명에서 기생충 용균물과 배양후 검출한다. LbeIF4A 항원 및 기생충 모두는 배타적인 Th1 사이토킨 프로파일을 유도하는 LbeIF4A로의 모든 점막성 환자 PBMC로부터의 IFN-γ 및 IL-2의 생산을 유도한다. 사실상, LbeIF4A는 항원 자극에 앞서 대부분의 점막성 환자의 배양된 PBMC에서 측정된 IL-10 mRNA의 합성을 하향조절한다. 흥미롭게도, 점막성 환자로부터의 PBMC를 사용하는 경우와 같이, LbeIF4A는 또한 DCL 환자 VA에서 IL-10 mRNA의 합성을 하향조절한다.

<134> 일반적으로, IFN-γ 및 IL-2에 대한 mRNA의 농도는 항원 자극에 앞서 측정가능한 양 내지 에티디움 브로마이드 염색된 겔중 항원 자극후 용이하게 측정가능한 농도를 증가시킨다. 그러나, 사이토킨 IL-4 및 IL-10에 대한 mRNA는 분석된 PCR생성물을 방사활성 프로빙 후에만 측정가능하다.

<135> 유사한 PCR 분석을 피부 환자로부터 유도된 PBMC상에서 수행한다(도 4b). 분석된 4명의 환자중 3명(VS, JP 및 CA(보이지 않음))으로부터의 휴지 PBMC는 검사된 Th1(IFN-γ 및 IL-2) 및 Th2(IL-4 및 IL-10) 사이토킨 모두에 대한 고농도의 mRNA를 나타낸다. IL-10 및 IL-4가 아닌 IFN-γ 및 IL-2에 대한 mRNA는 4번째(AS) 피부 환자의 휴지 PBMC에서 측정된다. 그러므로, 점막성 환자에서와 대조적으로, 피부 레슈

마니아증 환자는 이들의 휴지 PBMC에서 IL-10 mRNA, 또한 IL-4, IL-2 및 IFN-γ를 가진다. 흥미롭게도, IL-2 및 IFN-γ에 대한 mRNA가 항원의 부재하에서 PBMC의 시험관내 배양후 측정가능한 농도로 감소되는 반면, IL-10에 대한 것은 영향을 받지않거나 증가된 채 유지된다. 그러므로, 피부 환자에서, IL-10 mRNA의 휴지 농도는 안정하거나 이들의 PBMC는 항원 자극의 부재하에서 IL-10 mRNA를 합성하는 것을 계속한다. 피부 레슈마니아증 환자에 있어서의 이러한 반응이 관찰되는 것은 자가 치유 병소를 실험하는 자가 만성 피부 레슈마니아증을 발달시키는 체질인 개체를 구별가능하게 할 수 있다.

<136> 시험된 모든 피부 환자는 IL-2 및 IFN-γ에 대한 mRNA의 합성을 상향조절함으로써 LbeIF4A 항원 및 기생충 용균물에 반응하고, 4명의 환자중 2명(VS 및 AS)에서, IL-4 mRNA의 농도는 또한 기생충 용균물로 자극한 후 증가한다. 측정가능한 "휴지" 농도의 IL-10 mRNA를 가진 3명의 환자(VS, JP 및 CA)중에서, LbeIF4A 및 기생충 용균물은 IL-10 mRNA의 발현을 하향조절한다.

<137> 자가-치유 CL을 가진 환자로부터의 PBMC의 사이토킨 mRNA 프로파일은 ML 환자의 것과 (a)측정가능한 수준의 휴지 PBMC를 갖는 한 개체를 제외한, 분석된 4명의 환자중 3명으로부터의 IL-10 mRNA는 측정가능한 수준의 IL-2, IFN-γ 및 IL-4를 가지나 IL-10 mRNA는 거의 없거나 전혀 없다는 점: (b)IL-2, IFN-γ 및 IL-4의 mRNA가 백그라운드 수준으로 감소되나, IL-10 mRNA는 항원없이 PBMC를 배양후 상향 조절되는 점; 및 (c)유도된 LbeIF4A이 대부분의 자가-치유 개체의 배양된 PBMC에서의 Th1-타입 사이토킨만의 mRNA 발현을 증가시키고 IL-10 mRNA의 발현을 하향조절하나, 레슈마니아 용균물이 혼합된 Th1/Th2 사이토킨 프로파일의 발현을 자극한다(나타내지않음).

<138> 실시예 7

<139> PBMC에서 사이토킨 분비의 LbeIF4A 자극

<140> 본 실시예는 서열확인번호: 2(실시예 3에서 서술된 바와 같음)의 N-말단 48개의 잔기가 부족한 LbeIF4A 항원 또는 기생충 용균물로의 자극후 엘. 브라질렌시스-감염된 개체로부터의 PBMC의 분비된 사이토킨의 상층 농도를 제시한다. PBMC 상층액의 분취량을 IFN-γ, TNF-α, IL-4 및 IL-10에 대해 검정한다. IFN-γ은 마우스 항-사람 IFN-γ mAb(Chemicon, Temucula, CA) 및 폴리클로날 토끼 항-사람 IFN-γ 혈청을 사용하는 이중 샌드위치 ELISA로 정량한다. 사람 rIFN-γ(Genentech Inc., San Francisco, CA)를 표준 곡선을 생성하기 위해 사용된다. IL-4를 마우스 항-사람IL-4 mAb(M1) 및 폴리클로날 토끼 항-사람 IL-4 혈청(P3)를 사용하여 이중 샌드위치 ELISA로 상층액에서 정량한다. 사람 IL-4(Immunex Corp., Seattle, WA)를 50pg/ml 내지 1ng/ml 범위의 표준 곡선을 만들기 위해 사용한다. IL-10은 분비된 IL-10을 "포획"하기 위한 랫트 항-사람 IL-10 mAb (PharMingem, San Diego, CA, Cat. #18551D)를 사용하여 측정하고 기질로서 스트렙타비딘 접합된 고추냉이 과산화효소 및 ABTS와 결합된 IL-10은 바이오틴화된 랫트 항사람 IL-10 mAb(PharMingem, San Diego, CA, Cat. #18562D)를 사용하여 측정한다. 표준 곡선은 사람 rIL-10(DNAX Research Institute, Palo Alto, CA) 30pg/ml 내지 2ng/ml를 사용하여 수득된다.

<141> 모든 3종류의 환자 그룹으로부터의 세포(즉, 점막성, 피부 및 자가-치유 피부 환자)는 10μg/ml LbeIF4A 항원 또는 10μg/ml 기생충 용균물로 자극후 IFN-γ 및 IFN-α를 분비한다(도 5 및 도 6). 유사하게, LbeIF4A는 엘. 트로피카 감염된(사막 폭풍 환자) 환자가 IFN-γ를 증식시키거나 분비시키도록 자극한다(보이지 않음). 환자 PBMC의 상층액에서 측정된 IFN-γ 및 IFN-α 모두의 수준은 감염되지 않은 대조군의 수준보다 더욱 상당히 높다. 항원 자극이 없는 경우, 점막성 환자(6명중 5명)로부터의 PBMC만을 상층액 TNF-α(60 내지 190pg/ml)을 측정가능한 수준으로 생산한다. IL-4 또는 IL-10은 분석된 어떤 상층액에서도 거의 또는 전혀 측정되지 않고(보이지 않음), 이는 사용된 ELISA 검정의 검출 한계이하임을 의미한다. 비교해 보면, 레슈마니아 용균물은 또한 PBMC를 자극하여 IFN-γ 및 IFN-α를 분비하고, 어떤 환자에서, IL-10도 측정된다(보이지 않음). LbeIF4A는 엘. 브라질렌시스-감염된 개체로부터의 PBMC에서 주된 Th1 사이토킨 프로파일을 자극하나, 기생충 용균물을 혼합된 Th1/Th2 사이토킨 프로파일을 자극하는 것이 결과로부터 증명된다.

<142> 항원 자극후 점막성 및 자가-치유 개체로부터의 환자 PBMC의 상층액에서 측정된 TNF-α의 수준은 피부 환자로부터의 수준보다 더욱 높다(도 6). 5명중 4명의 점막성 환자로부터의 PBMC(JV, SZ, AB 및 MB)는 기생충 용균물로 자극후 비감염된 대조군으로부터의 PBMC의 배양물에서 측정된 수준보다 TNF-α의 상층액 수준(0.80 내지 2.20ng/ml)이 더욱 높다. 유사하게, 동일한 PBMC를 LbeIF4A로 자극하여 0.66 내지 3.14ng/ml 범위의 TNF-α의 상층액 수준을 생성한다. 감염되지 않은 대조군과 비교하여, 분석된 6명의 자가-치유 개체중 3명으로부터의 PBMC(GS, HS 및 MCT)는 기생충 용균물에 반응하여 더욱 높은 수준으로 TNF-α를 생성하고, 6명의 자가-치유 개체중 6명 모두(GS, MS, AH, DJ, HS 및 MCT)가 LbeIF4A에 반응에 대해 TNF-α의 수준을 더욱 높게 생성한다. 기생충 용균물에 대한 반응에서 피부 레슈마니아증 환자로부터의 PBMC에 의해 생성된 TNF-α의 수준은 감염되지 않은 대조군과 비교가능하다. 그러나, LbeIF4A는 이들 환자 3명에서 PBMC(RJ, AD 및 JS)를 자극하여 TNF-α를 생성한다. 이러한 환자는 급성 피부 레슈마니아증을 발달시키는 과정에 있을 수 있다.

<143> 실시예 8

<144> LbeIF4A에 의한 IL-12 생성의 자극

<145> 본 실시예는 LbeIF4A가 엘. 브라질렌시스-감염된 개체로부터의 PBMC, 배양된 사람 대식구, 정상적인 공여체의 혈액으로부터의 부착성 PBMC 및 사람 골수종 백혈병 세포주 THP-1를 자극하여 IL-12를 자극하는 것을 보여준다. IL-12는 세포내 세균 또는 기생충 감염에서 세포 매개된 면역성, Th1 반응의 발생 및 IFN-γ 생성의 발달에서 중요한 면역조절 역할을 수행한다. 사용된 LbeIF4A 폴리펩타이드는 서열 확인번호: 2(실시예 3에서 서술된 바와 같음)의 N-말단 48개의 잔기가 부족한 LbeIF4A 항원이다.

<146> IL-12 p40을 mAb 쌍 C11.79/C8.6을 사용하여 RIA(10pg/ml의 검출한계)[참조: D'Andrea et al.,

J. Exp. Med. 179: 1387-1398, 1992]로 세포-비함유 상층액에서 측정한다. 생물학적으로 활성인 IL-12 p70 헤테로이량체(1pg/ml의 검출한계)를 문헌[참조: Kubin et al., Blood 83: 1847-1855, 1994]에 서술된 바와 같이 서술된다.

<147> 도 7a는 10μg/ml LbeIF4A(LeIF)는 점막성 환자 PBMC를 자극하여 항원(Lb)으로서 10μg/ml 기생충 용균물로 관찰된 IL-12 p40 수준보다 더욱 상당히 높은 수준의 배양된 상층액에서 배양된 상층액중 IL-12 p40을 분비하는 것을 보여준다. 용균물 또는 항원이 없이 분비되는 IL-12 p40의 양도 또한 나타난다(Med.). 동일한 도면은 또한 10μg/ml IL-10은 LbeIF4A(LeIF+IL-10) 또는 용균물(Lb+IL-10)으로 자극후 환자 PBMC로 IL-12 p40의 생성을 하향조절한다.

<148> p40은 기생충 용균물(Lb)에 대한 반응에서 더 이상 검출되지 않지만 비감염된 개체로부터의 PBMC는 또한 LbeIF4A(LbIF, 도 7b)와 배양하는 경우 IL-12 p40을 생성한다. 이는 항원 자극후 정상적인 PBMC보다 IFN-γ를 5 내지 100배 더 생성하는 환자 PBMC에서 관찰된 용균물-유도된 p40중 IFN-γ에 대한 역할을 제안할 수 있다(도 5).

<149> 항원-자극된 PBMC 배양물에서 관찰된 IL-12 p40이 생물학적으로 활성 사이토킨을 반영하는지 여부를 결정하기 위해, IL-12 p70을 이 배양물에서 또한 검정한다(도 7c 및 도 7d). 일반적으로, p70 생성이 p40의 것과 상당하고, 이는 생물학적으로 활성 IL-12이 환자 및 정상적인 PBMC에서 LbeIF4A에 대한 반응에서 생산되는 것을 증명한다.

<150> LbeIF4A는 또한 배양된 사람 대식구(도 9a) 및 부착성 PBMC(도 9b)에서 IL-12 생성을 자극한다. 부착성 세포는 Ficoll- hypaque 밀도 구배 원심분리에 의해 정상적인 공여체의 혈액으로부터 분리된다. $2x10^6$ PBMC를 RPMI 500μℓ, 2% 사람 AB 혈청에서 2시간 동안 배양한다. 부착성 세포를 PBS로 3회 플레이트를 세척함으로써 정제한다. 각각의 자극마다 시험 배지(RPMI, 2% 사람 AB 혈청) 500μℓ를 첨가한다(IFN- 1000U/ml, LbeIF4A(Lf) 10μg/ml). 상층액을 18시간후 취한다.

<151> 부착성 PBMC의 IL-12 생성을 5일된 PHA 아세포로 포획 생검정하여 측정한다. 요약하면, IL-12 포획 항체 C11.5.14(Wistar Institute)를 96웰 플레이트상에서 피복한다. 표준으로 재조합 IL-12 및 유도 실험의 상층액을 4시간동안 항온처리한다. 몇번의 세척 단계후, 5일된 PHA 아세포를 첨가하고 이들 아세포의 증식은 부착성 세포의 상층액에서 IL-12 농도를 측정하기 위해 사용된다.

<152> 대식구는 부착성 세포($2x10^6$ PBMC)를 5일동안 시험 배지에서 배양함으로써 생성된다. 이후 대식구를 PBS로 세척하고, RPMI 500μℓ, 2% 사람 AB 혈청 및 1000U/ml IFN-γ를 첨가한다. 대식구를 LbeIF4A(10μg/ml)로 자극하거나, 배지(M)만에서 배양한다. 한 세트에서, LbeIF4A 대조군 대식구를 IFN-γ 없는, RPMI 500μℓ 및 2% 사람 AB 혈청중 LbeIF4A와 항온처리한다. 상층액을 18시간 후 취하고 IL-12 독립성 증식의 유도를 위해 사용된다. 요약하면, 5일된 아세포를 2일동안 대식구 상층액과 항온처리한다. 마지막 18시간동안, ^3H 티미딘을 첨가한다. 지시된 바와 같이 중화 항-IL-12 폴리클로날 염소 혈청(5μg/ml)을 첨가한다.

<153> 또한, LbeIF4A는 사람 골수종 벽혈병 세포주, THP-1에서 IL-12 생성을 자극한다(도 10). 세포를 5% 태 송아지 혈청을 함유하는 내독소-부존재 RPMI 배지에서 24 내지 48시간동안 10^6 세포/mL에서 배양한다. 10μg/ml LbeIF4A는 IFN-γ로 상승작용시켜 THP-1 세포를 자극하여 IL-12를 분비시킨다. 이들 결과는 백신으로서의 LbeIF4A의 유용성을 나타낸다.

<154> 실시예 9

<155> INF-γ 생성의 LbeIF4A 유도에 대한 IL-12 및 IL-10의 효과

<156> 본 실시예는 서열확인번호: 2(실시예 3에서 서술된 바와 같음)의 N-말단 48개의 잔기가 부족한 LbeIF4A 폴리펩타이드에 대한 반응에서 IL-12, IL-10 및 IFN-γ중 상호작용을 검사한다. 도 8a에서 보이는 바와 같이, 점막성 레슈마니아 환자로부터의 PBMC를 10ng/ml 항-IL-12(LbeIF+항-IL-12) 또는 IL-10(LeIF+IL-10)의 부재(LeIF) 또는 존재하에서 10μg/ml LbeIF4A로 자극하고 배양된 상층액을 IFN-γ 분비에 대해 검정한다. 항-IL-12 mAb 및 IL-10 모두가 LbeIF4A-유도된 IFN-γ 분비의 생성을 막는다. 그러나, 항-IL-12 mAb은 레슈마니아 용균물로 자극후 단지 부분적으로 IFN-γ의 생성을 감소시킨다(도 8b). 이러한 결과는 IFN-γ 생성은 IL-12 독립성이고 IL-10에 의해 억제되나, IL-12의 생성이 IFN-γ 의존성 및 독립성 경로에 의해 조절된다.

<157> 실시예 10

<158> 마우스에서 TH1 프로파일의 LbeIF4A 자극

<159> 본 실시예는 서열확인번호: 2(실시예 3에서 서술된 바와 같음)의 N-말단 48개의 잔기가 결실된 LbeIF4A 폴리펩타이드가 BALB/c 마우스에서 주된 Th1 사이토킨 프로파일을 자극한다. 동물을 보조제로서 quilA 또는 CFA를 사용하여 LbeIF4A 또는 8E(환자 PBMC가 높은 수준의 IL-10을 생산하도록 자극하는 엘. 브라질렌시스 마이토콘드리아 hsp70의 C-말단 부분)로 프라이밍한다. 프라이밍 10일 후, 림프절(LN) 세포를 재조합 항원으로 시험관내에서 재자극하고 상층 배양물을 분비된 사이토킨에 대해 분석한다. 결과(도 11)는 LbeIF4A로 프라이밍된 마우스로부터 LN 세포가 두 형태의 보조제를 사용하여 LbeIF4A로 항원자극(challenge)한 후 거의 배타적인 Th1 사이토킨(IFN-γ)을 증식시키고 분비한다는 것을 보여준다. 대조적으로, 8E로 프라이밍된 마우스로부터의 LN 세포는 보조제로서 CFA로 Th0 반응 또는 8E에 의한 항원자극에 대한 특이적 반응에서 Th2 사이토킨, IL-4 및 IL-10에 대해 강하게 치우치면서, Th1/Th2 타입 사이토킨(보조제로서 quilA)를 일으킨다. 유사하게, 기생충 용균물로 프라이밍된 마우스는 혼합된 사이토킨 프로

파일을 생성하고, 결과는 백신 후보로서 기생충 용균물만의 사용에 대한 논의를 일으킨다(도 11).

<160> 이들 결과는 LbeIF4A가 보조제로서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. LbeIF4A가 실험적인 레슈마니아증, IFN-γ 및 IL-12에서 보호와 가장 분명하게 연관된 2개의 사이토킨을 포함하는 강력한 Th1 반응을 유도하기 때문에, 이 항원의 레슈마니아증에 대한 마우스를 보호하는 능력을 연구한다. BALB/c 마우스를 보조제 없이 LbeIF4A로 한번 면역화시키고 7일 후 엘. 메이저 로 피부 감염시킨다. 대조군 그룹과 비교하여, LbeIF4A는 엘. 메이저 감염에 대한 상당한 보호를 제공한다(도 12). 그러므로 엘. 브라질렌시스로부터 유도된 이종성 항원은 엘. 메이저 감염에 대해 보호할 수 있고, 이는 "보호성" 에피토프중 최소한 일부가 두 기생충간 보존된다는 것을 제안한다.

<161> 상기로부터, 본 발명의 실시양태가 예시의 목적으로 본원에서 서술되었지만, 다양한 변형이 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않고 가능하다.

서열 목록

(1)일반 정보

(i)출원인: 코렉사 코포레이션

(ii)발명의 명칭: 보호성 면역 반응 및 IL-12의 생산의 자극과 증강을 위한 화합물 및 방법

(iii)서열 수. 2개

(iv)통신 주소:

(A)주소. 시드 앤드 베리

(B)거리: 5번 애비뉴 701 콜롬비아 센터 6300

(C)시. 시애틀

(D)주: 워싱톤

(E)국가: 미국

(F)우편번호. 98104-7092

(v)컴퓨터 판독형:

(A)매체형: 플로피 디스크

(B)컴퓨터: IBC PC 호환성

(C)운영 체제: PC-DOS/MS-DOS

(D)소프트웨어: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi)최근 출원 자료:

(A)출원인 번호: US

(B)출원일: 1995.04.24.

(C)분류:

(viii)대리인/대리기관 정보:

(A)성명: 카들섹 엔 티

(B)등록번호: P-39,444

(C)참조/등록번호: 210121 4019C

(ix)원거리통신 정보:

(A)전화: (206) 622-4900

(B)텔렉스. (206) 682-6031

(2)서열확인번호: 1

(i)서열 특징:

(A)길이. 1618개 염기쌍

(B)유형: 핵산

(C)쇄수: 일본쇄

(D)위상: 선형

(ii)분자형: cDNA

(ix)특징:

(A)명칭/특징요소: CDS

(B)위치: 115...1326

(xi)서열 설명: 서열확인번호: 1

【서열 1】

```
CCACTCTCTC GGTCGTCTGT CTCCCACGCG CGCACGCAGT TGATTTCCGC CTTCTTAAAC    60

GCTCTCTTTT TTTTTATTTT TCACCTGACC AACCGCACCA CGTCGGCCTC CATC ATG      117
                                                            Met
                                                             1

TCG CAG CAA GAC CGA GTT GCC CCA CAG GAC CAG GAC TCG TTC CTC GAC      165
Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu Asp
            5                  10                  15

GAC CAG CCC GGC GTC CGC CCG ATC CCG TCC TTC GAT GAC ATG CCG TTG      213
Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro Leu
        20                  25                  30
```

```
CAC CAG AAC CTT CTG CGC GGC ATC TAC TCG TAC GGC TTC GAG AAA CCG      261
His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys Pro
     35                  40                  45

TCC AGC ATC CAG CAG CGC GCC ATC GCC CCC TTC ACG CGC GGC GGC GAC      309
Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly Asp
 50                  55                  60                  65

ATC ATC GCG CAG GCG CAG TCC GGT ACC GGC AAG ACG GGC GCC TTC TCC      357
Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe Ser
                 70                  75                  80

ATC GGC CTG CTG CAG CGC CTG GAC TTC CGC CAC AAC CTG ATC CAG GGC      405
Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln Gly
             85                  90                  95

CTC GTG CTC TCC CCG ACC CGC GAG CTG GCC CTG CAG ACG GCG GAG GTG      453
Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu Val
        100                 105                 110

ATC AGC CGC ATC GGC GAG TTC CTG TCG AAC AGC GCG AAG TTC TGT GAG      501
Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys Glu
    115                 120                 125

ACC TTT GTG GGT GGC ACG CGC GTG CAG GAT GAC CTG CGC AAG CTG CAG      549
Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu Gln
130                 135                 140                 145

GCT GGC GTC GTC GTC GCC GTG GGG ACG CCG GGC CGC GTG TCC GAC GTG      597
Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp Val
                150                 155                 160

ATC AAG CGC GGC GCG CTG CGC ACC GAG TCC CTG CGC GTG CTG GTG CTC      645
Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val Leu
            165                 170                 175
```

```
GAC GAG GCT GAT GAG ATG CTG TCT CAG GGC TTC GCG GAT CAG ATT TAC      693
Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile Tyr
        180                 185                 190

GAG ATC TTC CGC TTC CTG CCG AAG GAC ATC CAG GTC GCG CTC TTC TCC      741
Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe Ser
    195                 200                 205

GCC ACG ATG CCG GAG GAG GTG CTG GAG CTG ACA AAG AAG TTC ATG CGC      789
Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met Arg
210                 215                 220                 225

GAC CCC GTA CGC ATT CTC GTG AAG CGC GAG AGC CTG ACG CTG GAG GGC      837
Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu Gly
                230                 235                 240

ATC AAG CAG TTC TTC ATC GCC GTC GAG GAG GAG CAC AAG CTG GAC ACG      885
Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp Thr
            245                 250                 255

CTG ATG GAC CTG TAC GAG ACC GTG TCC ATC GCG CAG TCC GTC ATC TTC      933
Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile Phe
        260                 265                 270

GCC AAC ACC CGC CGC AAG GTG GAC TGG ATC GCC GAG AAG CTG AAT CAG      981
Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn Gln
    275                 280                 285

AGC AAC CAC ACC GTC AGC AGC ATG CAC GCC GAG ATG CCC AAG AGC GAC     1029
Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser Asp
290                 295                 300                 305

CGC GAG CGC GTC ATG AAC ACC TTC CGC AGC GGC AGC TCC CGC GTG CTC     1077
Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val Leu
                310                 315                 320
```

```
GTA ACG ACC GAC CTC GTG GCC CGC GGC ATC GAC GTG CAC CAC GTG AAC      1125
Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val Asn
            325                 330                 335

ATC GTC ATC AAC TTC GAC CTG CCG ACG AAC AAG GAG AAC TAC CTG CAC      1173
Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu His
        340                 345                 350

CGC ATT GGC CGC GGC GGC CGC TAC GGC GTA AAG GGT GTT GCC ATC AAC      1221
Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile Asn
    355                 360                 365

TTC GTG ACG GAG AAA GAC GTG GAG CTG CTG CAC GAG ATC GAG GGG CAC      1269
Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly His
370                 375                 380                 385

TAC CAC ACG CAG ATC GAT GAG CTC CCG GTG GAC TTT GCC GCC TAC CTC      1317
Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr Leu
                390                 395                 400

GGC GAG TGA GCGGGCCCCT GCCCCCCTTC CCTGCCCCCC TCTCGCGACG              1366
Gly Glu  *

AGAGAACGCA CATCGTAACA CAGCCACGCG AACGATAGTA AGGGCGTGCG GCGGCGTTCC    1426

CCTCCTCCTG CCAGCGGCCC CCCTCCGCAG CGCTTCTCTT TTGAGAGGGG GGCAGGGGGA    1486

GGCGCTGCGC CTGGCTGGAT GTGTGCTTGA GCTTGCATTC CGTCAAGCAA GTGCTTTGTT    1546

TTAATTATGC GCGCCGTTTT GTTGCTCGTC CCTTTCGTTG GTGTTTTTTC GGCCGAAACG    1606

GCGTTTAAAG CA                                                        1618
```

(2)서열확인번호: 2

(i)서열 특징:

(A)길이: 403개 아미노산

(B)유형: 아미노산

(D)위상: 선형

(ii)분자형: 단백질

(xi)서열 특징: 서열확인번호: 2

【서열 2】

```
Met Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu
 1               5                  10                  15

Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro
            20                  25                  30

Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys
        35                  40                  45

Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly
    50                  55                  60

Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe
65                  70                  75                  80

Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln
                85                  90                  95
```

Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu
100 105 110

Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys
115 120 125

Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu
130 135 140

Gln Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp
145 150 155 160

Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val
165 170 175

Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile
180 185 190

Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe
195 200 205

Ser Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met
210 215 220

Arg Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu
225 230 235 240

Gly Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp
245 250 255

Thr Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile
260 265 270

Phe Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn
275 280 285

Gln Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser
290 295 300

Asp Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val
305 310 315 320

Leu Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val
325 330 335

Asn Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu
340 345 350

His Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile
355 360 365

Asn Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly
370 375 380

His Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Gly Glu

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a)서열확인번호: 1의 115번 내지 1323번 뉴클레오타이드;

(b)적당히 엄격한 조건하에서 서열확인번호: 1의 115번 내지 1323번 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화하고, 레슈마니아(Leishmania)-감염된 개체로부터 수득된 말초 혈액 단핵세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열; 및

(c)상기 DNA 서열중 하나에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA로 이루어진 그룹중에서 선택되는 DNA 서열을 포함하는 단리된 DNA 분자.

청구항 2

제1항의 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제2항의 발현벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포.

청구항 4

제3항의 숙주 세포를 DNA 서열의 발현을 촉진하는 조건하에서 배양하고, 레슈마니아-감염된 개체

로부터 수득된 말초 혈액 단핵세포에서 Th1면역 반응을 자극하는 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하여, 레슈마니아-감염된 개체로부터 수득된 말초 혈액 단핵세포에서 Th1면역 반응을 자극하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 5

제1항의 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 6

서열확인번호: 2의 49번 내지 403번 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드 또는 보존적 치환 변형 또는 이둘 모두로만 상이한 이의 변이체.

청구항 7

(a)말초 혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 및 이의 배합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포를 포함하는 환자로부터 수득한 생물학적 샘플을, 제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드와 접촉시키고;

(b)세포의 반응을 측정하는 단계를 포함하여, 면역 반응을 일으키는 환자의 능력을 평가하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 반응이 증식성 반응인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 반응이 인터페론-γ, 인터루킨-2, 인터루킨-12 p70, 인터루킨-12 p40 서브유닛, 인터루킨-1 및 종양 괴사 인자-α로 이루어지는 그룹중에서 선택되는 사이토킨의 분비인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 반응이 인터페론-γ, 인터루킨-2, 인터루킨-12 p40 서브유닛, 인터루킨-1 및 종양 괴사 인자-α로 이루어지는 그룹중에서 선택되는 사이토킨을 암호화하는 mRNA의 발현인 방법.

청구항 11

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 항원을 포함하는, 항원에 대한 세포성, 제액성 또는 이둘 모두의 면역 반응을 증강시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 레슈마니아 기생충에 결합하는 항체의 생성을 자극하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, Th1 면역 반응을 자극하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

말초 혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 및 이의 배합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포를 포함하는, 레슈마니아-감염된 개체로부터 수득한 생물학적 샘플을, 제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 샘플에서 Th1 반응을 자극하는 방법.

청구항 15

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 인터루킨-10의 발현을 하향조절하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 16

말초 혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 및 이의 배합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포를 포함하는, 레슈마니아-감염된 개체로부터 수득한 생물학적 샘플을, 제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 샘플에서 인터루킨-10의 발현을 하향조절하는 방법.

청구항 17

항원이, 말초 혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포, 대식구 및 이의 배합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포를 포함하는, 레슈마니아-감염되지 않은 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에 의한 인터루킨-12의 생성을 자극할 수 있는지의 여부를 측정하는 단계를 포함하여, 백신 조성물의 제조에 있어서 항원의 적합성을 측정하는 방법.

청구항 18

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 19

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 인터루킨-12 생성을 자극하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 20

말초 혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 수상돌기 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포를 포함하는 생물학적 샘플을 제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 샘플에서 인터루킨-12의 생성을 자극하는 방법.

청구항 21

제5항 또는 제6항의 폴리펩타이드 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 인터루킨-12 자극에 대해 반응성인 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 질환이 감염성 질환인 약제학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 질환이 암인 약제학적 조성물.

요약

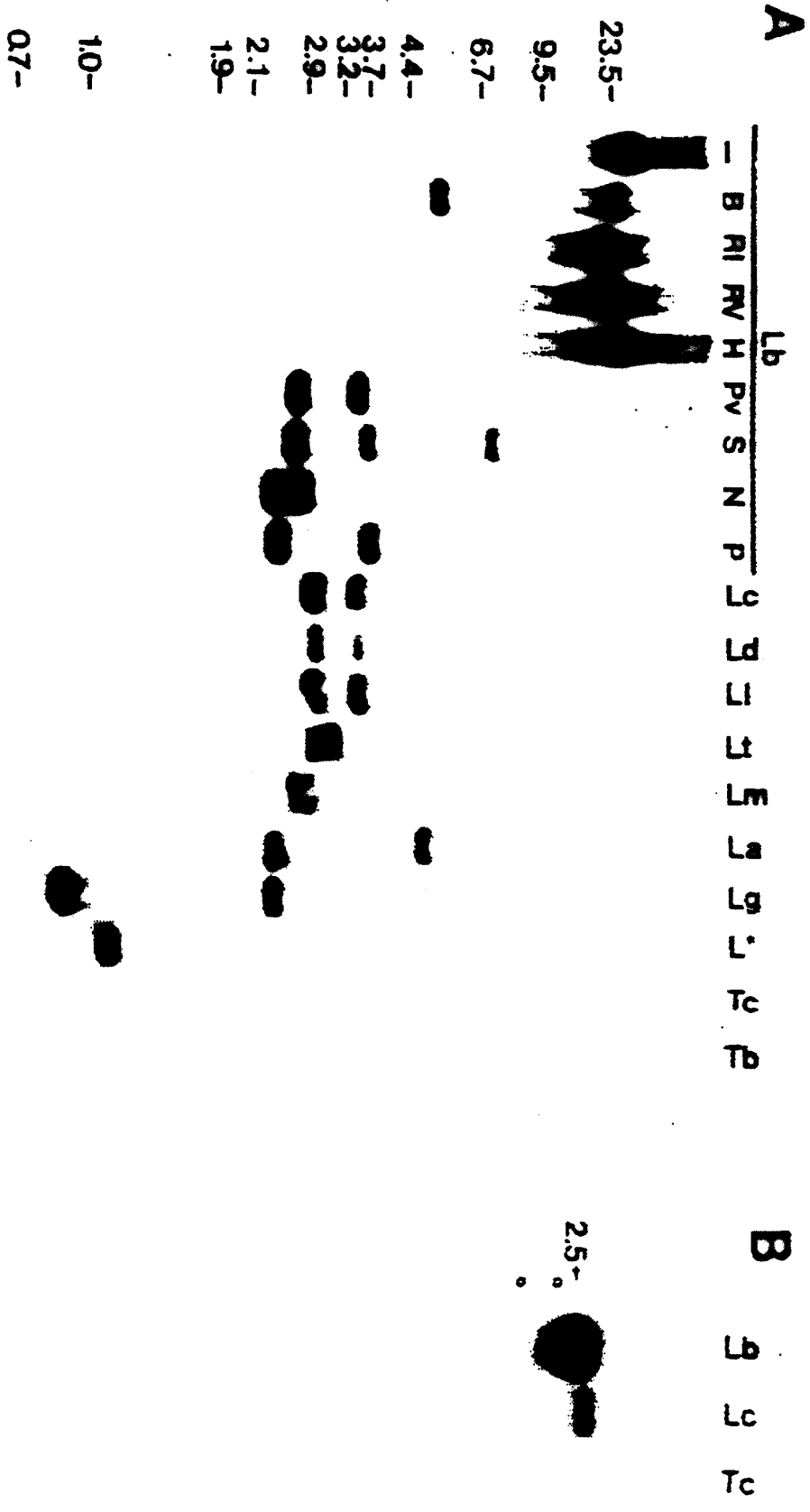
면역 반응을 자극하고 증강시키기 위한 화합물 및 방법, 및 환자의 면역 반응을 평가하기 위한 화합물 및 방법을 기술한다. 기술된 화합물에는 진핵세포 개시 인자 4A의 레슈마니아 브라질렌시스 동족체의 적어도 생물학적 활성 부분을 포함하는 폴리펩타이드 또는 이의 변이체가 포함된다. 이러한 화합물은 환자에서 뿐만 아니라 단리된 세포 및 세포 배양물에서 Th1 면역 반응 및 IL-12 생성을 자극하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 레슈마니아증 또는 기타 질환에 걸릴 수 있는 환자의 평가 및 치료에 유용하다.

대표도

도1

도면

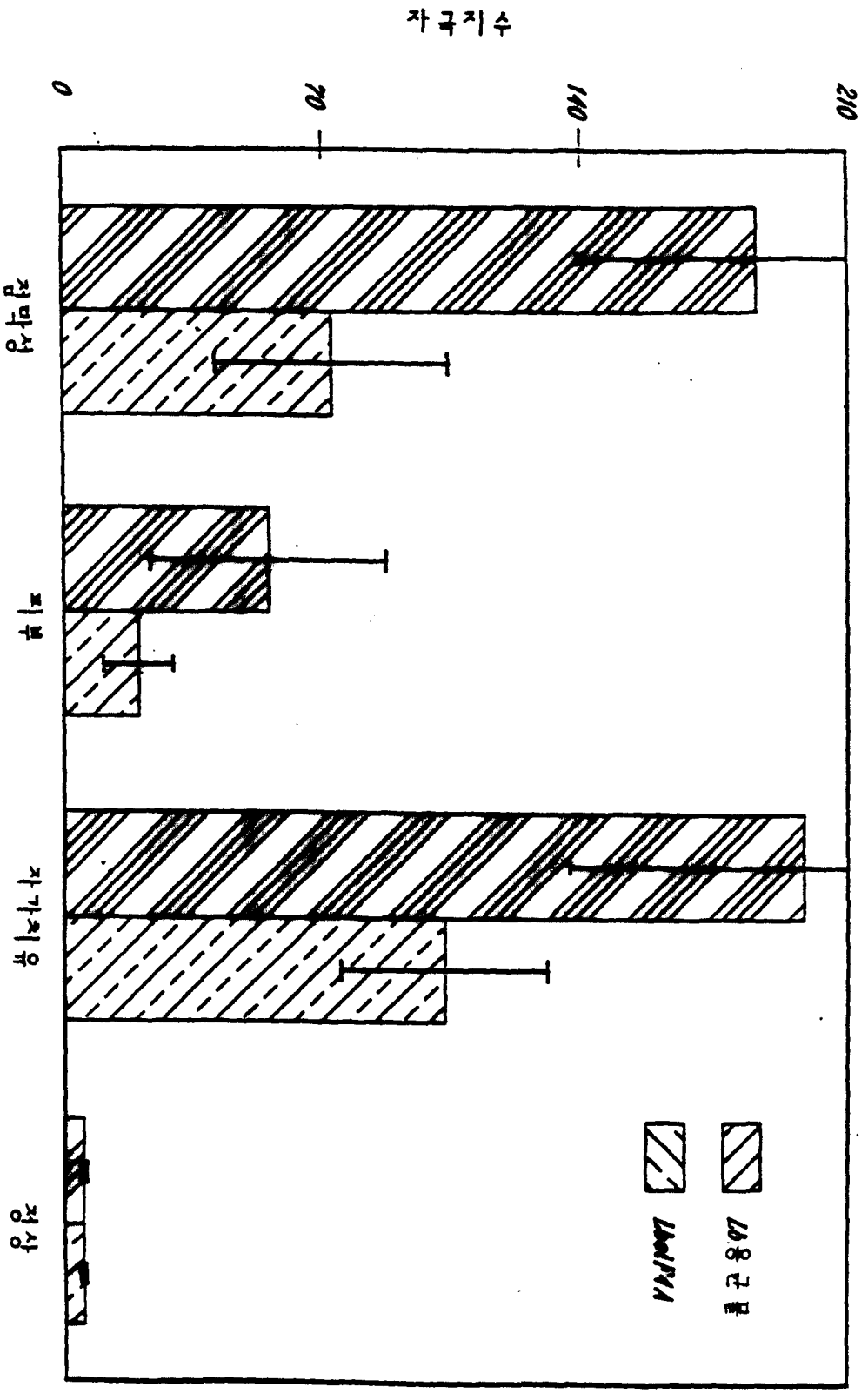
도면1


A
23.5-
9.5-
6.7-
4.4-
3.7-
3.2-
2.9-
2.1-
1.9-
1.0-
0.7-
Lb
B
RI
RV
H
Pv
S
N
P
Lc
Ld
Le
Lf
La
Lg
L'
Tc
Td
B
2.5+
Lb
Lc
Tc

도면2



도면3



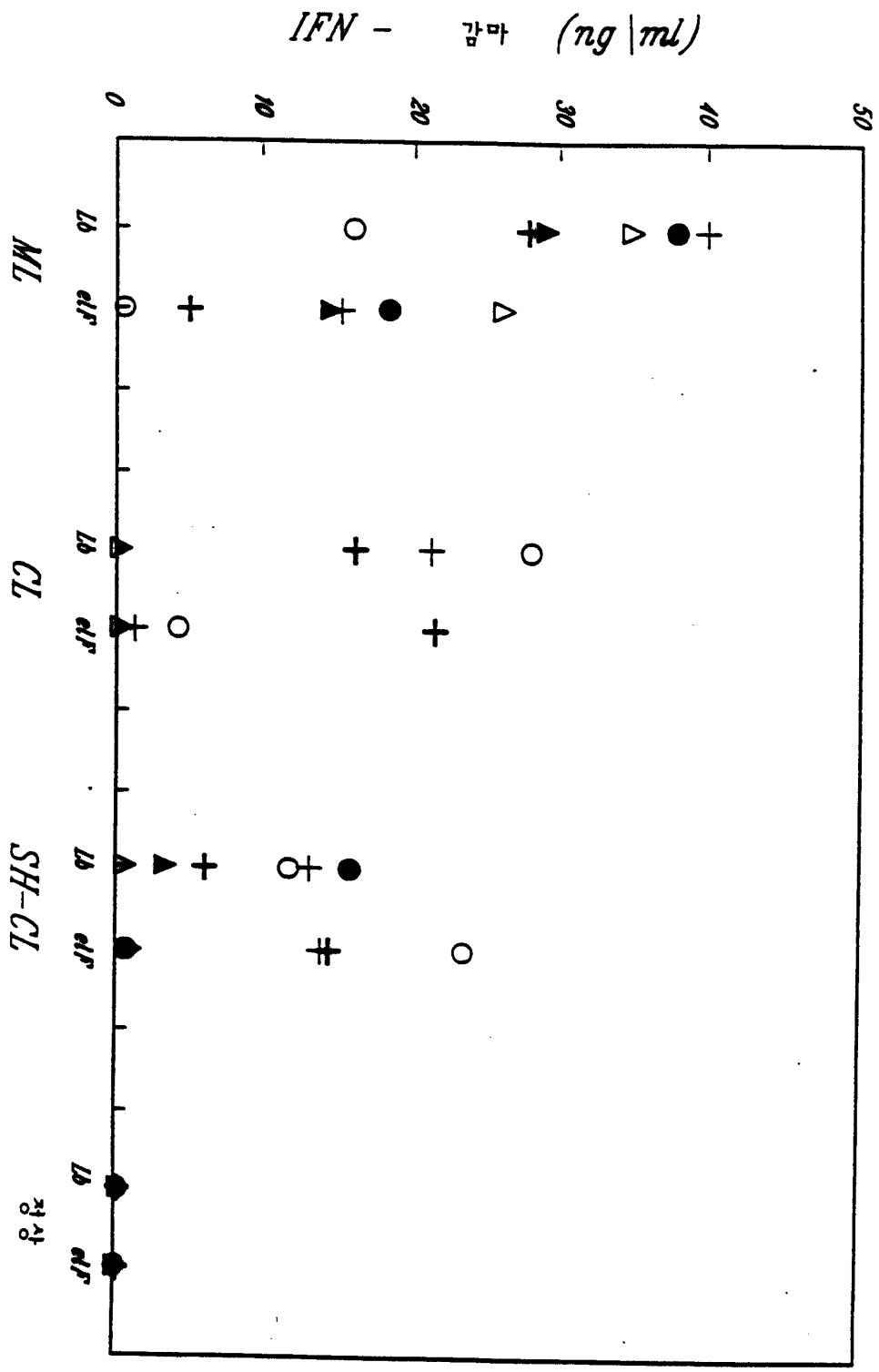
도면4a



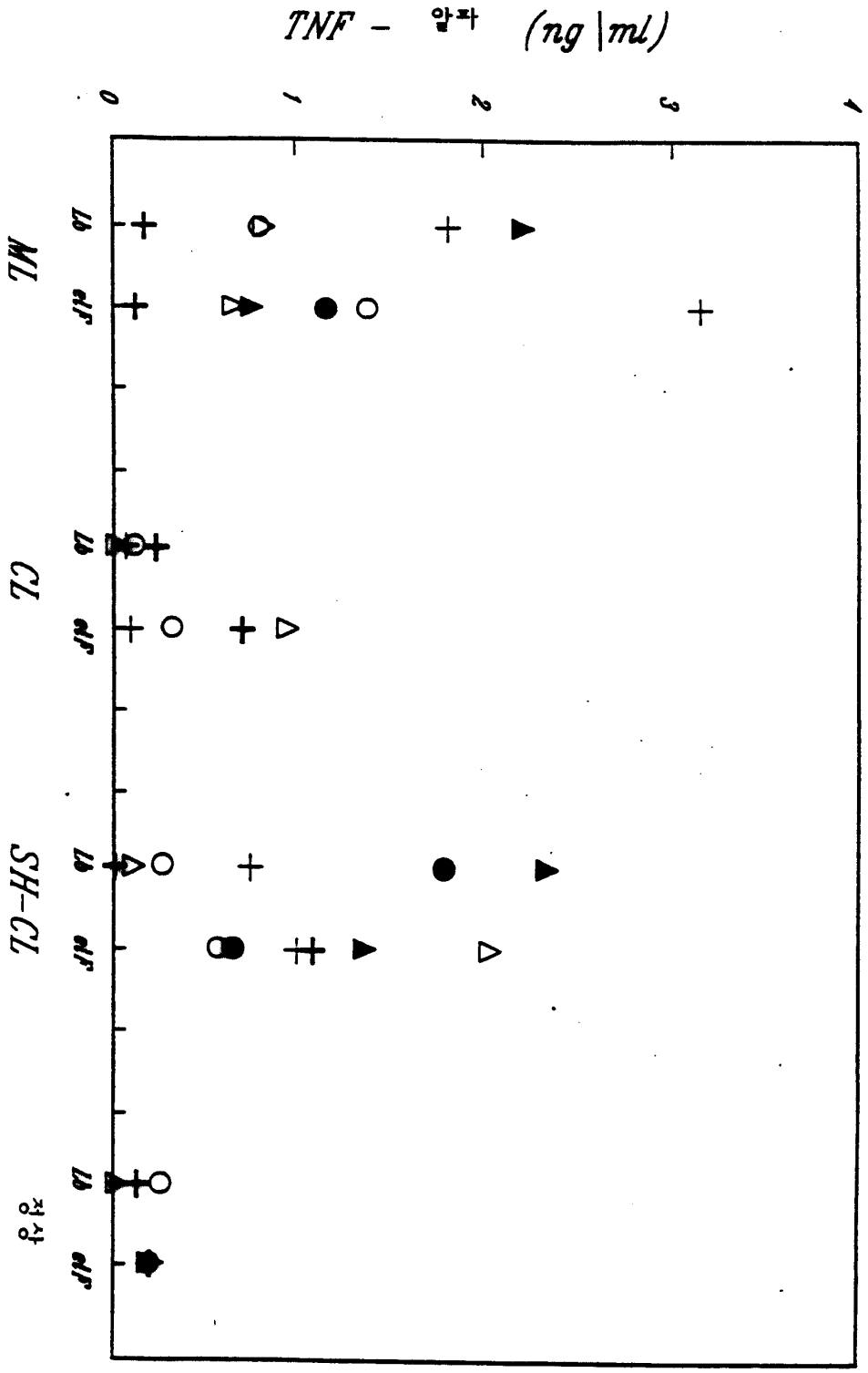
도면4b



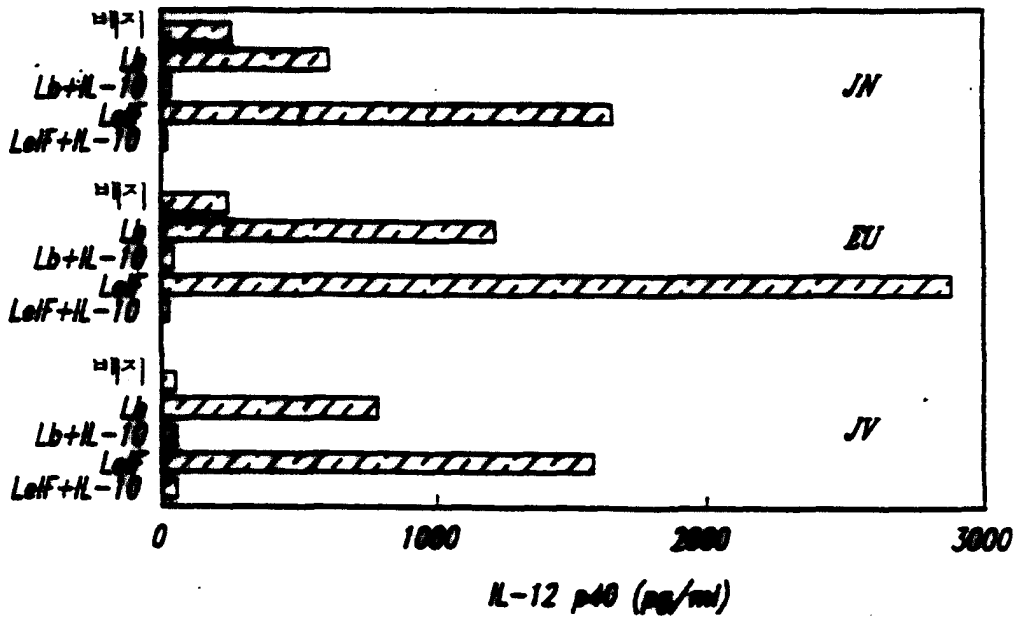
도면5



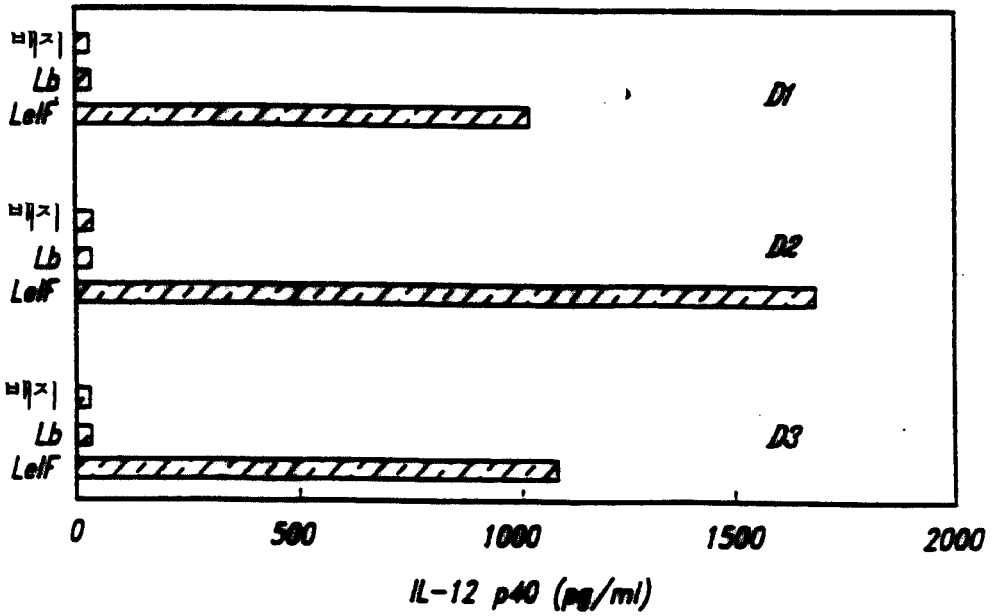
도면6



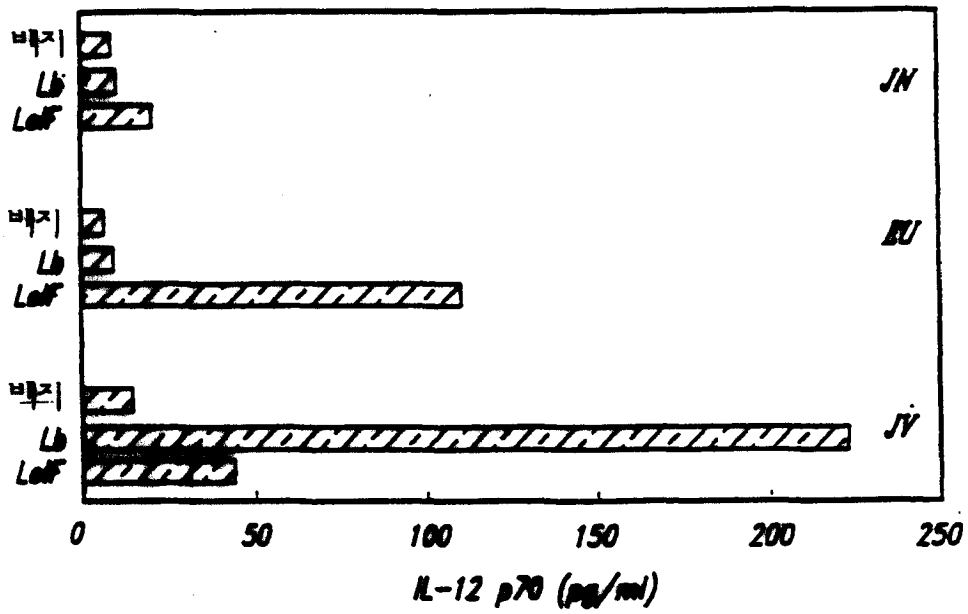
도면7a


배지
Lb
Lb+IL-10
LelF
LelF+IL-10
JN
EU
JV
0
1000
2000
3000
IL-12 p40 (pg/ml)

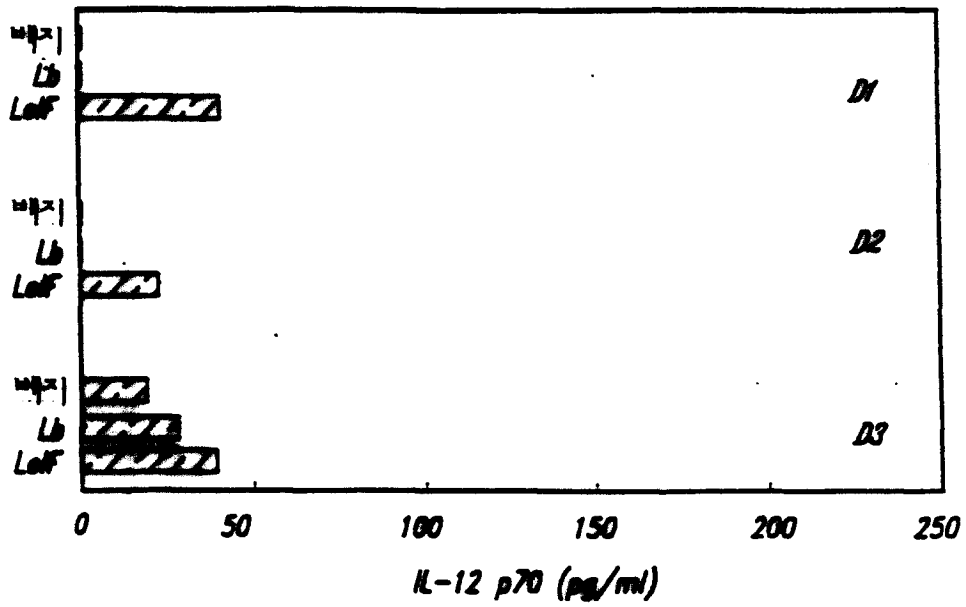
도면7b


배지
Lb
LelF
D1
D2
D3
0
500
1000
1500
2000
IL-12 p40 (pg/ml)

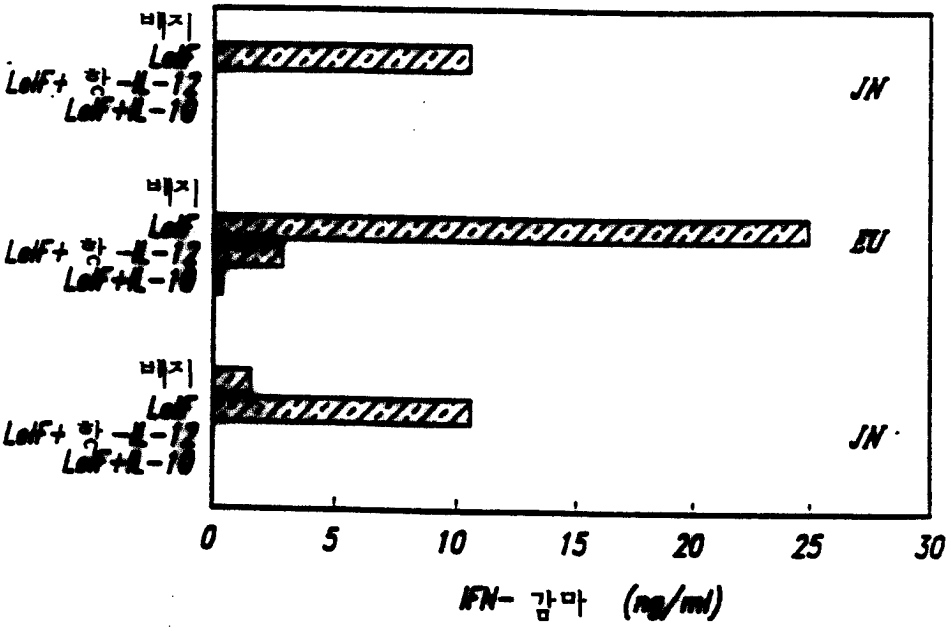
도면7c


바지
Lb
Leaf
JN
JU
JV
0
50
100
150
200
250
IL-12 p70 (pg/ml)

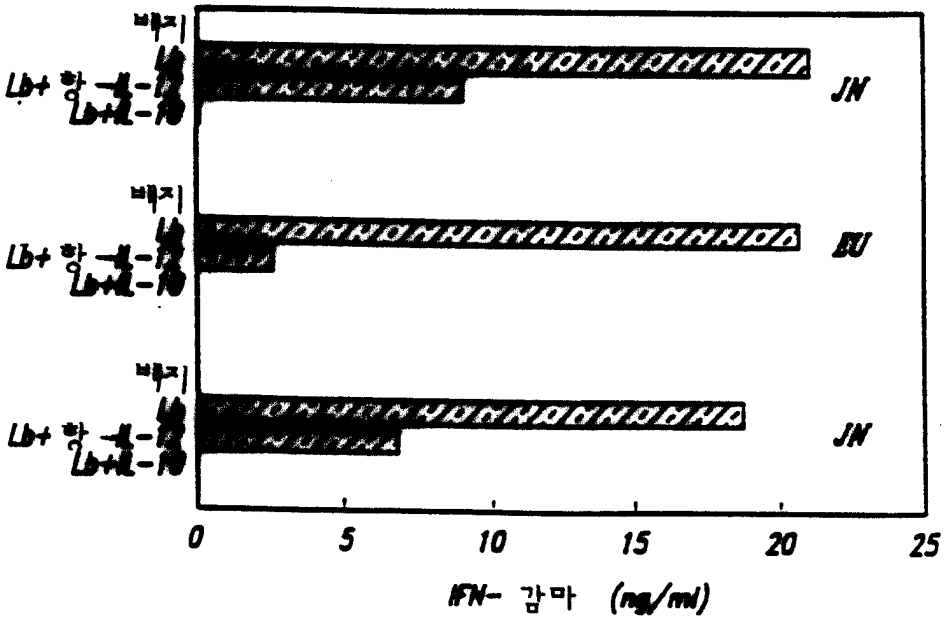
도면7d


바지
Lb
Leaf
D1
D2
D3
0
50
100
150
200
250
IL-12 p70 (pg/ml)

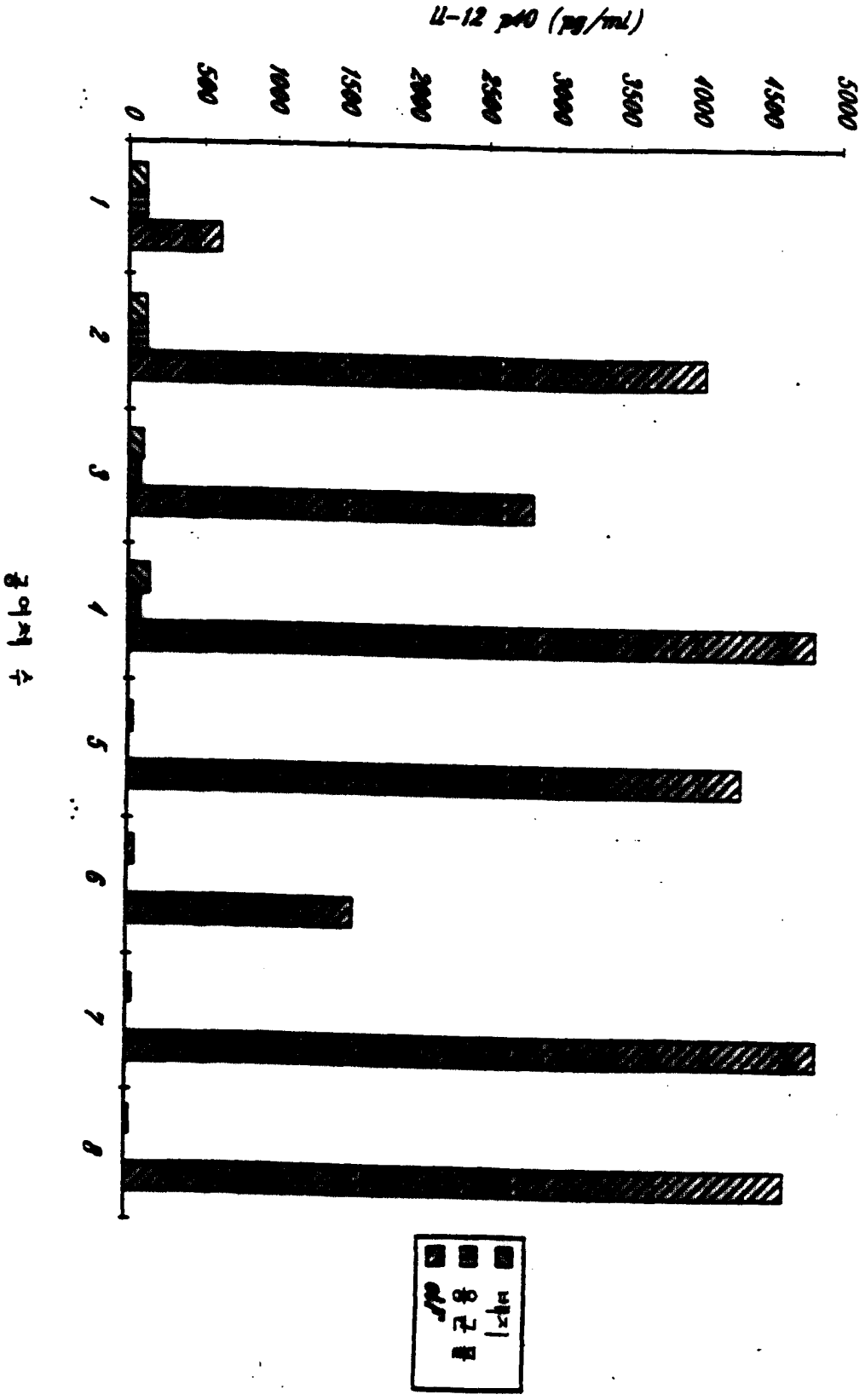
도면8a


배지
LaIF
LaIF+ 항-IL-12
LaIF+IL-10
JN
배지
LaIF
LaIF+ 항-IL-12
LaIF+IL-10
EU
배지
LaIF
LaIF+ 항-IL-12
LaIF+IL-10
JN
0
5
10
15
20
25
30
IFN- 감마 (ng/ml)

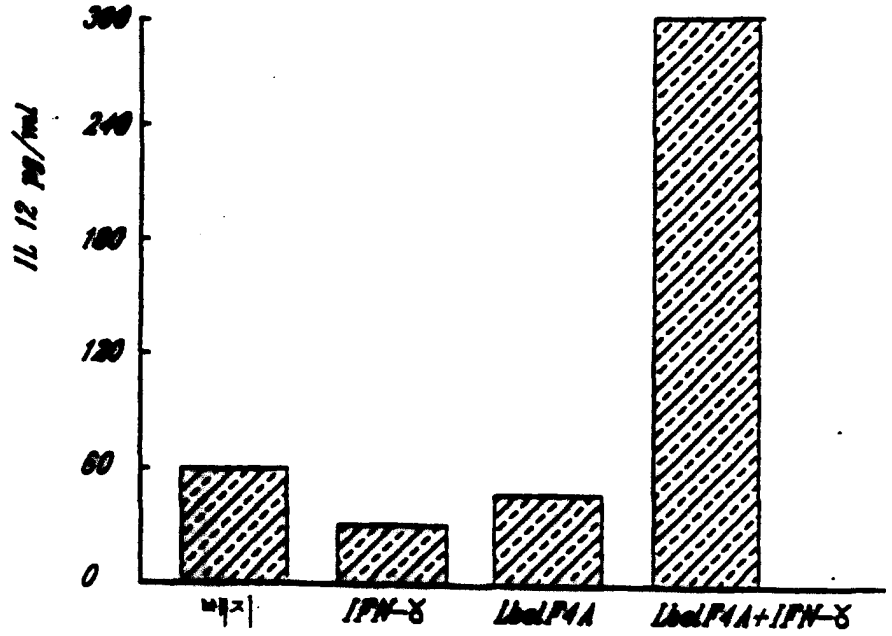
도면8b


배지
Lb+ 항-IL-12
Lb+IL-10
JN
배지
Lb+ 항-IL-12
Lb+IL-10
EU
배지
Lb+ 항-IL-12
Lb+IL-10
JN
0
5
10
15
20
25
IFN- 감마 (ng/ml)

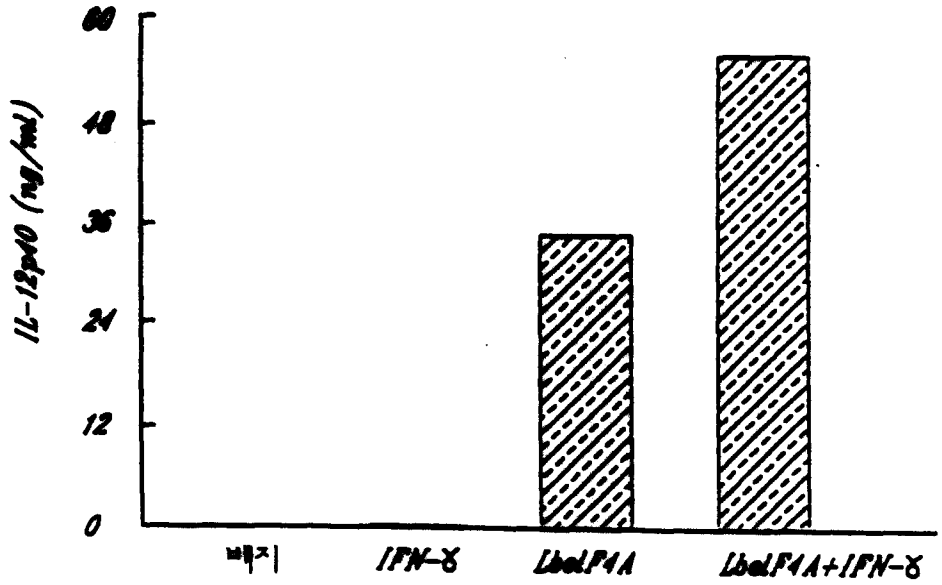
도면9a


U-12 p40 (pg/ml)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
1
2
3
4
5
6
7
8
공여체 수

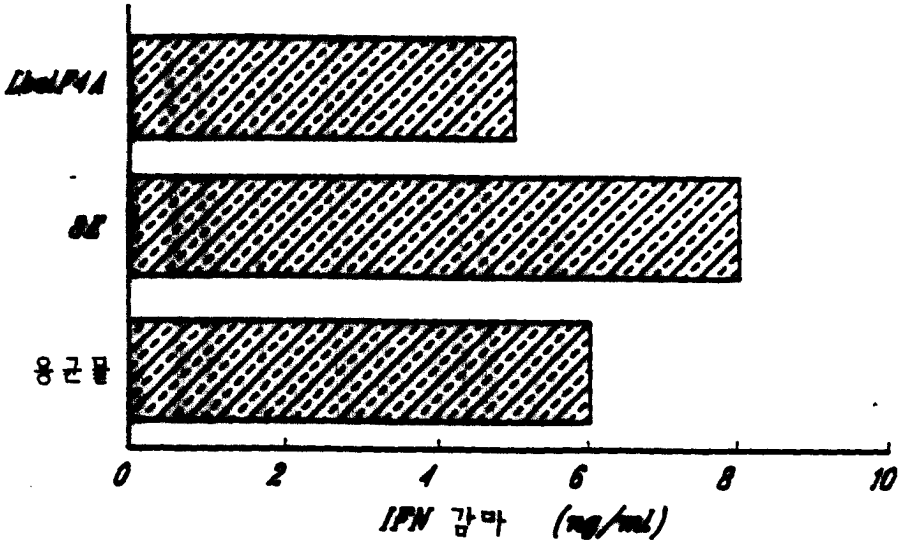
도면9b


300
240
180
120
60
0
IL 12 pg/ml
배지
IFN-γ
LbelP4A
LbelP4A+IFN-γ

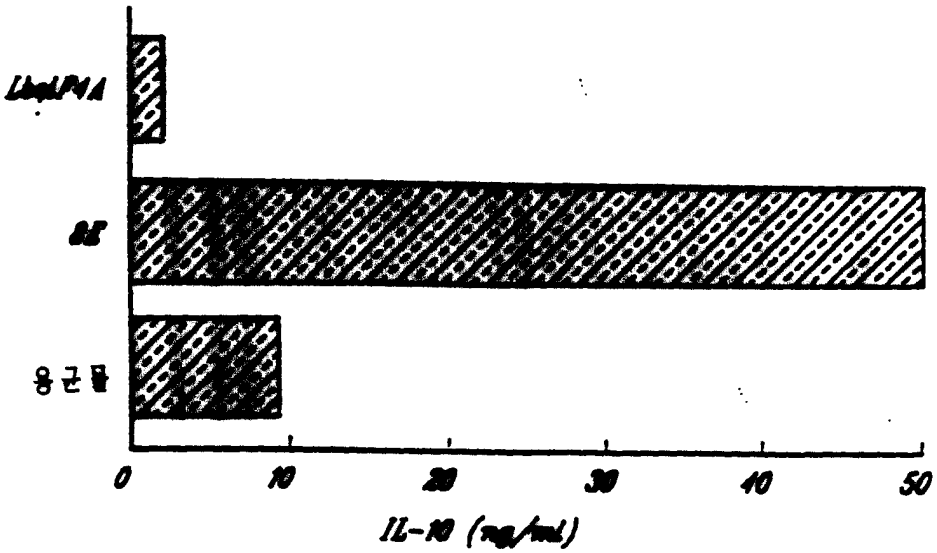
도면10


60
48
36
24
12
0
IL-12p40 (ng/ml)
배지
IFN-γ
LbelP4A
LbelP4A+IFN-γ

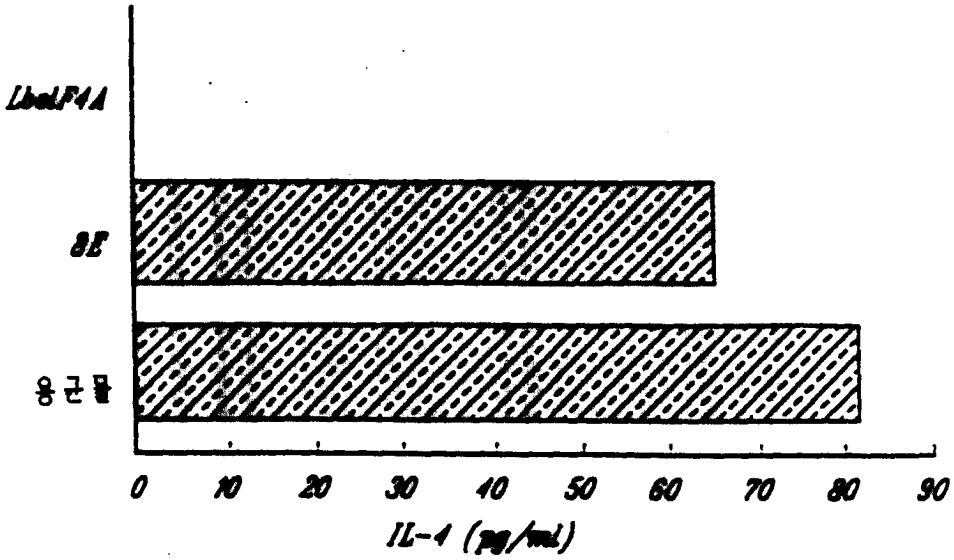
도면11a


Lbal.F4A
8E
용균물
0
2
4
6
8
10
IFN 감마 (ng/ml)

도면11b


Lbal.F4A
8E
용균물
0
10
20
30
40
50
IL-10 (ng/ml)

도면11c



도면12

