

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷ (11) 공개번호 특2001-0040618
A61K 39/21 (43) 공개일자 2001년05월 15일

(21) 출원번호 10-2000-7008489
(22) 출원일자 2000년08월03일
 번역문제출일자 2000년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/02503 (87) 국제공개번호 W0 1999/39735
(86) 국제출원출원일자 1999년02월04일 (87) 국제공개일자 1999년08월 12일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 감비아 짐바브웨
EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스
 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투
 칼 스웨덴 핀란드 사이프러스
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비소
국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바
 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스
 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀
 란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기
 즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레
 소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니
 아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아
 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간
 다 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스
 웨덴 싱가포르 그레나다 크로아티아 인도네시아 인도 가나 감비아
 유고슬라비아 시에라리온 짐바브웨

(30) 우선권주장 60/073,943 1998년02월06일 미국(US)
(71) 출원인 리서치 디벨롭먼트 파운데이션 와일러 제임스 에프.
 미국 네바다주 89703 카슨 시티 노쓰 디비전 스트리트 402
(72) 발명자 버넷매리수잔
 미국버지니아주22032페어팩스스윈턴드라이브4963
 키토조지배리
 미국텍사스주78731오스틴크레스트웨이5102
(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) 사람 면역결핍 바이러스용 생 백신

요약

본 발명은 특이적 HIV 단백질을 표면 발현시키도록 유전공학적으로 처리된 약독화된 살모넬라 균주를 사
용하여, HIV에 대한 모델 생 백신의 개발 및 마우스에서 이러한 백신의 테스트를 기재하고 있다. 표면
노출에 요구되는 Lpp-OmpA 유전자를 함유하고 그 다음에 HIV-1 단백질, 역전사효소 또는 트랜스액티베이
팅 단백질(Tat)에 대한 유전자를 함유하는 2개의 재조합 플라스미드가 제공된다. 이들 플라스미드를 약
독화된 살모넬라 균주 SL3261 내로 전기천공시키고, 항원 발현을 확인한다. 이어서, 이들 생 백신을 사
용하여 마우스에 경구 접종시키고, 이어서 상기 마우스를 대상으로 하여 HIV 항원에 특이한 헬퍼 T 세포
반응과 분(fecal) IgA 반응에 대해 시험한다.

대표도

도1

색인어

살모넬라 균주, Lpp-OmpA 유전자, HIV-1 단백질, 트랜스액티베이팅 단백질.

명세서

연방 자금 조달 공고

NIH 바이오테크놀로지 트레이닝 그랜트(Biotechnology Training Grant)가 본 발명에 일부 투자하였다. 결과적으로, 미국 정부가 본 발명에 대한 특정 권리를 지니고 있다.

기술분야

본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 생화학 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 언급하면, 본 발명은 사람 면역결핍 바이러스(HIV)용 생(live) 백신 개발에 관한 것이다.

배경기술

백신은 비용면에서 가장 효율적인 감염성 질환 치료제이다. 성공적인 백신은 마진, 유행성이하선염, 백일해, 풍진, 회백수염, 파상풍 및 두창 발병율을 현격하게 감소시켰다. HIV에 유효한 백신 개발이 절실이 요망된다. 세계 보건 협회의 견해에 따르면, 2000년까지 전세계적으로 4천만명이 HIV에 감염될 것으로 추정되고 있다.

HIV 백신 개발 접근법에 관한 최근 평가가 문헌[Schultz in Changing Paradigms of an HIV Vaccine(Schultz, 1996)]에 기술되어 있다. 상기 문헌에서 슐츠(Schultz)는 몇몇 패러다임(paradigm)에 관해 논의하고 있으며, 이중 첫번째 것이 "무균성 면역"이라 불리운다. 본래, AIDS를 예방하기 위해서는 HIV 감염이 완전하게 방지되어야만 한다고 여겨졌었다. 이러한 목적을 달성하기 위한 논리적인 방법은 고역가의 중화 항체를 유도하는 것이다. 이러한 백신에 합당한 유일한 항원은 중화 에피토프를 함유하는 HIV 엔벨로프(envelope) 단백질인 gp120 및 gp41이다. 이들 백신을 개발하기 위한 여러 가지 일반적인 방법들이 사용되었다. 첫째, 유전공학적으로 처리된 발현 시스템을 사용하여 엔벨로프 아단위 단백질인 gp120 또는 gp160을 생성하였다. 이어서, 재조합 단백질을 명반(alum) 내로 제형화시키거나 신규한 보조제에서 제형화시킨다. 두번째 방법은 HIV env 유전자를 백시니아 및 카나리폭스(canarypox)와 같은 생 벡터 내로 삽입시키는 것을 포함한다. 세 번째 방법은 무관한 에피토프를 제거하기 위하여 펩티드 에피토프를 사용함으로써 면역 시스템이 관련된 중화 에피토프에 역점을 두도록 한다.

"무균성 면역" 패러다임에 속하는 두 가지 부가의 일련의 실험은 비-사람 영장류에서 행해진 연구 조사를 포함한다. 완전히 불활성화된 백신이 극히 통상적이고 매우 유효하였다. 그러나, HIV의 경우에는, 이러한 연구가 사람에게서 결코 시도된 바가 없는데, 이는 주로, 바이러스성 입자가 결코 완전하게 불활성화되지 않은 경우에 야기될 심각한 문제때문이다.

HIV 백신 개발에 대한 두번째 패러다임은 백신 연구에 대한 새로운 개념을 포함하고 있진 않지만, HIV에 대처하기 위한 접근법의 변화를 나타낸다. 감염 초기 예방이 아니라, 감염이 시작되지만, 이를 억제하여 궁극적으로 이를 클리어하게 한다. 백신은 바이러스 하중이 신속하게 클리어되거나 또는 더 이상 어떠한 증상도 나타나지 않게 하거나 다른 기관으로의 전이를 허용하지 않는 수준으로 감소되는 경우에 유효한 것으로 간주될 수 있다[참조: Johnston, 1997]. 이러한 전망 상의 변화를 가져다 주는 주요 연구 개발 중의 하나는 혈중 AIDS 바이러스 수준이 1일 생산량과 수 많은 양의 HIV 클리어런스(clearance) 간의 비교적 안정한 발란스를 지시하고 있다는 사실이다[참조: Wei, 1995, Ho, 1995]. 이러한 발견은 상기 면역 시스템이 상기 바이러스를 퇴치하는데 상당히 성공적이긴 하지만 시간이 지난 후에 결국에는 HIV로 사망하게 된다는 것을 보여주고 있다.

HIV 바이러스에 관한 현재의 몇몇 연구 조사는 gag 유전자, 프로테아제 유전자, 및 pol 유전자 일부를 사용하고 있다. 부가의 작업은 비-감염성이고 안전한 형태의 완전히 불활성화된 바이러스인 슈도비리온(pseudovirion)을 사용하는 것에 역점을 두고 있다. 이러한 백신 중의 하나가 현재 작은 영장류 동물에게 시험중이다. 합성 펩티드 백신이 또한 탐구되었으며 이는 특정한 지질 잔기에 접합되는 경우에 마우스에서 세포독성 T 임파구 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 이들 펩티드 생성물 중의 몇몇에 대해서는 현재 사람을 대상으로 한 시험이 진행되고 있다. DNA를 이용한 백신이 또한 개발되고 있는데, 이는 이들이 비교적 저렴하고 용이하게 생성될 수 있기 때문이다. 초기 결과는 우수한 세포내 반응 뿐만 아니라 강력한 체액성 면역을 지시하고 있다[참조: Glaser, 1997].

대부분의 HIV 감염은 점막성 표면을 통하여 전염된다. 이러한 전염 경로는 활발한 점막성 면역 반응이 요망될 수 있다는 것을 강력히 제안하고 있다. 전통적으로, 이러한 반응을 점막성 표면에서 유발시키는 것은 어려운 일이다. AIDS에 대한 국가 협력 백신 개발 그룹의 9차 미팅(May, 1997)에서 유세이(Musey)가 제안한 최근의 보고서에는 감염된 남성과 여성의 생식관의 점액에 HIV 특이적 세포독성 T 임파구가 존재한다고 기재되어 있다. 남성 정액 샘플과 여성 경부 브러싱(brushings)으로부터 점막성 T 세포를 분리하고 이를 HIV와 상이한 특이적 항원으로 자극시킨다. 반응이 HIV Env, Gag 및 Pol 단백질에 대해 나타났다. 동일한 미팅(May, 1997)에서 클러리치(Clerici)가 제안한 부가의 연구 조사는 점막성 IgA에 의해 감염되지 않은 파트너의 예방이 가능하다는 것을 지적하고 있다.

생 백신을 개발하는 것은 사(dead) 백신(아단위 백신)을 개발하는 것 보다 몇 가지 이점을 지니고 있다. 약독화된 세균 균주를 유전공학적으로 조작하여 상이한 병원체로부터 발병력을 지닌 항원을 발현시킨다. 이들 세균 중의 몇몇이 이들 중의 야생형에 대해서 뿐만 아니라 상기 항원에 대한 유전 물질을 제공하는 병원체에 대해서도 체액성 면역 반응과 세포성 면역 반응 모두를 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다[참조: Curtiss, 1989].

살모넬라(Salmonella) 균주는 장내 점막에서 M 세포와 우선적으로 결합되는 능력을 지니고 있다. 이러

한 성향은 정상적으로 상기 면역 시스템이 특정 반응을 개시하도록 하여 감염을 클리어시키긴 하지만, 살모넬라는 탐지를 피하는 독특한 방식으로 진행되었다. 점막 내에 존재하기만 하면, 살모넬라는 실제적으로 엔도솜(endosome) 내의 세포 내로 흡수되고, 거기에서 탐지되지 않은 채로 있을 수 있다. 사람 세포주 중에 이러한 엔도솜 내부를 나누는 필름 상에 세균을 포획시킨다[참조: Sztein, 1995]. 이러한 살모넬라 적응 습성은 백신을 개발하는데 상당한 도움을 주는 것으로 입증될 수 있다. 약독화된 충분한 살모넬라가 세포 내부에서 생존할 수 있는 경우에는, 아마도 이것이 장기간 감염을 정착시키는데 도움을 줄 수 있고, 그 결과 외래 항원에 대한 면역을 지속시킬 수 있다.

살모넬라를 이용하는데 있어서의 또 다른 중요한 이점은 상기 세균이 보조제로서 작용하여, 상기 항원이 단독으로 투여되는 경우보다 더 큰 면역 반응을 야기시킨다는 것이다. 단독으로 투여된 아단위 백신은 종종 보다 약한 반응을 유도하며 현재 사람에게 사용 가능한 보조제는 거의 없다. 보조제의 도움을 받는 경우일지라도, 대부분의 아단위 백신을 비경구 운반하는 것은 점막성 표면에서의 분비성 반응을 유도하지 못하거나 또는 강력한 T 세포 반응도 자극하지 못한다. 앞서 언급된 바와 같이, 강력한 세포 매개된 반응과 점막성 면역 모두는 HIV 감염 클리닝을 가능하게 하는데 중요한 것으로 여겨지고 있다.

선행 기술은 사람 면역결핍 바이러스용으로 저렴한 생 백신을 제시하고 있지 않다. 본 발명은 이러한 당해 분야의 오랜 숙원과 요망을 충족시켜 준다.

발명의 요약

본 발명은 특이적 HIV 단백질을 표면 발현시키도록 유전공학적으로 처리된 약독화된 살모넬라 균주를 사용하여, HIV에 대한 모델 생 백신의 개발을 기재하고 있다. 한 양태에서는, 표면 노출에 요구되는 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드 및 사람 면역결핍 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 사람 면역결핍 바이러스용 생 백신이 제공된다.

본 발명의 한 양태에서는, 표면 노출에 요구되는 Lpp-OmpA 유전자를 함유하고 그 다음에 HIV-1 단백질, 역전사효소 또는 트랜스액티베iting 단백질(Tat)에 대한 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드가 제공된다. 바람직한 양태에 있어서, 상기 플라스미드는 약독화된 살모넬라 균주 SL3261 내로 전기천공시킨다.

본 발명의 또 다른 양태에서는, 당해 생 백신을 사용하여 마우스에 경구 접종시킨 다음 상기 동물을 대상으로 하여 HIV 항원에 특이한 헬퍼 T 세포 반응과 분(fecal) IgA 반응에 대해 시험한다.

본 발명의 기타 및 추가의 국면, 양태 및 이점은 다음에 제시되는 본 발명의 바람직한 양태에 관한 기재 내용으로부터 명백할 것이다. 이들 양태는 기술 목적으로 제시된 것이다.

도면의 간단한 설명

상기 인용된 본 발명의 특징, 이점 및 목적 뿐만 아니라 명백하게 될 기타 목적을 획득하고 이를 상세히 이해시키게 하기 위해서는, 상기 간략하게 요약된 본 발명의 보다 특정한 기재 내용이 첨부된 도면에 예시되는 본 발명의 특정한 양태를 참조로 할 수 있다. 이들 도면은 본 명세서의 일부를 형성한다. 그러나, 첨부된 도면은 본 발명의 바람직한 양태를 예시하는 것이므로 이로써 본 발명의 범위가 제한되지 않는다는 것을 인식해야 한다.

도 1은 재조합 플라스미드 pHART에 대한 콜로니 스크리닝을 도시한 것이다. 레인 1 및 12는 분자량 표준물을 함유하고 있다. 레인 2 내지 11은 HindIII로 분해된 플라스미드를 함유한다.

도 2는 재조합 pHAT에 대한 콜로니 스크리닝을 도시한 것이다. 레인 1은 분자량 표준물을 함유하고 있다. 나머지 레인은 HindIII로 분해된 플라스미드를 함유한다.

도 3은 이. 콜라이(E. coli) DH5 α -pHART의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1은 분자량 표준물을 함유한다. 레인 2, 3 및 4는 유도된 이. 콜라이 DH5 α -pHART, 유도되지 않은 이. 콜라이 DH5 α -pHART 및 대조군 이. 콜라이 DH5 α 각각의 완전한 세포 용해물이다. 레인 2 및 3에서의 독특한 밴드가 화살표로 지시되어 있다.

도 4는 이. 콜라이 DH5 α -pHART 조약한(crude) 막 제제의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1 및 2는 각각 이. 콜라이 DH5 α -pHART의 외막 분획 및 대조군 이. 콜라이 DH5 α 의 외막 분획이다. 레인 3 및 4는 각각 이. 콜라이 DH5 α -pHART의 완전한 막 분획 및 이. 콜라이 DH5 α 의 완전한 막 분획이다. 레인 1 및 3에서의 독특한 밴드가 화살표로 지시되어 있다.

도 5는 이. 콜라이 DH5 α -pHAT의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1, 2 및 3은 유도된 이. 콜라이 DH5 α -pHAT, 유도되지 않은 이. 콜라이 DH5 α -pHAT 및 대조군 이. 콜라이 DH5 α 각각의 완전한 세포 용해물을 함유한다. 레인 1 및 2에서의 독특한 밴드가 화살표로 지시되어 있다.

도 6은 SL3261-pHART의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1은 분자량 표준물을 함유한다. 레인 2 및 4는 SL3261-pHART의 완전한 세포 용해물을 함유한다. 레인 3 및 5는 대조군 SL3261의 완전한 세포 용해물을 함유한다. 레인 2 및 4에서의 독특한 밴드가 화살표로 지시되어 있다.

도 7은 SL3261-pHART의 내막 및 외막 분리물의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1 및 2는 SL3261-pHART 및 대조군 SL3261 각각의 외막 분획을 함유한다. 레인 3 및 4는 SL3261-pHART 및 대조군 SL3261 각각의 내막 분획을 함유한다.

도 8은 SL3261-pHAT의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1 및 2는 대조군 SL3261 및 SL3261-pHAT 각각의 완전한 세포 용해물을 함유한다. 레인 3은 분자량 표준물을 함유한다. 레인 2에서의 독특한 밴드가 화살표로 지시되어 있다.

도 9는 SL3261-pHAT 및 SL3261로부터의 내막 및 외막의 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 레인 1은 분자량 표준물을 함유한다. 레인 2 및 3은 SL3261-pHAT 및 대조군 SL3261 각각의 외막 분획을 함유한다. 레인

4 및 5는 SL3261-pHAT 및 대조군 SL3261 각각의 내막 분획을 함유한다.

도 10은 9주째 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스에서 측정된 역전사효소 특이적 IgA의 그래프를 도시한 것이다. 바 R-2, T-2, S-2, C-1 및 C-2는 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스, SL3261-pHAT 백신 접종된 마우스, SL3261 백신 접종된 마우스, PBS로 백신 접종된 대조군 마우스 및 앰피실린 상에서 유지된 PBS로 백신 접종된 대조군 마우스 각각으로부터 취한 샘플을 나타낸다.

도 11은 9주째 SL3261-pHAT 백신 접종된 마우스에서 측정된 Tat 특이적 IgA의 그래프를 도시한 것이다. 바 R-2, T-2, S-2, C-1 및 C-2는 SL3261-pHAT 백신 접종된 마우스, SL3261-pHAT 백신 접종된 마우스, SL3261 백신 접종된 마우스, PBS로 백신 접종된 대조군 마우스 및 앰피실린 상에서 유지된 PBS로 백신 접종된 대조군 마우스 각각으로부터 취한 샘플을 나타낸다.

도 12는 10주에 걸쳐 SL3261-pHART 마우스에서 측정된 역전사효소 특이적 IgA의 그래프를 도시한 것이다. 바 R-2는 앰피실린 상에서 유지시킨 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스로부터 취한 샘플을 나타낸다. C-2는 PBS 공급되고 앰피실린 상에서 유지시킨 대조군 마우스로부터 취한 샘플을 나타낸다.

도 13은 SL3261-pHART로 백신 접종된 마우스에서 3주째에 관찰된 증식 반응을 도시한 것이다. 이러한 마우스는 모두 SL3261-pHART로 백신 접종시켰다. 분리된 비장 세포를 제1 바(RT-RPMI)에 도시된 바와 같은 RPMI-1640(대조군 매질), 열 사멸된 SL3261(RT-SL 바), 역전사효소 2 μ g(RT-RT 2 μ g 바) 또는 역전사효소 10 μ g(RT-RT 10 μ g 바)와 함께 배양한다.

도 14는 SL3261-pHART로 백신 접종된 마우스에서 12주째에 관찰된 증식 결과를 도시한 것이다. 이러한 마우스는 모두 SL3261-pHART로 백신 접종시켰다. 분리된 비장 세포를 제1 바(RPMI)에 도시된 바와 같은 RPMI-1640(대조군 매질), 열 사멸된 SL3261(SL 바), 역전사효소 2 μ g(RT 2 μ g 바) 또는 역전사효소 10 μ g(RT 10 μ g 바)와 함께 배양한다.

발명의 상세한 설명

본 발명에서는, 약독화된 살모넬라 SL3261을 표면 발현 방법에 의해 HIV 항원을 면역 시스템에 운반하기 위한 비히클로서 사용하므로; 이러한 생 백신을 사용하여 마우스에 경구 접종한 다음, 상기 동물을 대상으로 하여 HIV 항원에 특이적인 면역 반응에 대해 시험한다.

본 발명의 한 양태에는, 이. 콜라이 외막 단백질 OmpA의 일정 부분에 연결된 이. 콜라이 지방단백질(Ipp) 시그널 서열로 이루어진 융합 작제물이 제공된다. 이러한 지방단백질 시그널 서열은 상기 단백질 작제물이 그람 음성 세균의 외막을 지시하는데 필요하고 N 말단의 첫번째 9개 아미노산으로 구성된다. 이러한 시그널이 상기 표면을 표적화하는데 필요하긴 하지만, 그 자체가 표면 노출되지는 않는다. 이러한 이유로 인해, ompA의 아미노산 46 내지 159를 상기 작제물에 가하는데, 이는 이들 잔기가 본래의 OmpA 단백질에 존재하는 8개 트랜스멤브레인(transmembrane) 영역 중의 5개를 암호화하기 때문이다. 이들 5개 루프는 표면 노출된 C 말단을 가지는데, 이러한 경우에 이는 이종 단백질에 융합된다. 초기 실험에서는, 표면 노출을 위해 선택된 외질 단백질이 β -락타마제이다. 면역형광, 세포 분획화 및 효소 활성 검정과 같은 방법을 통한 결과는 β -락타마제가 실제로 이. 콜라이의 외부 표면 상에 노출되었다는 것을 지시하고 있다[참조: Francisco, Earhart, Georgiou, 1992].

본 발명의 또 다른 양태에서는, HIV 항원으로서의 HIV-1 역전사효소 단백질이 제공된다. 이러한 단백질은 감염된 사람에게서 세포독성 T 임파구에 대한 표적이 되는 것으로 나타났다[참조: Walker, 1988, Lieberman, 1992, Rowland-Jones, 1995]. 강력한 세포-매개된 반응이 요망되기 때문에, 이로써 역전사효소가 우수한 후보가 된다. 부가적으로, 역전사효소 단백질을 암호화하는 HIV-1 pol 유전자가 상이한 1차 분리물 중에서 다른 HIV-1 유전자 보다 훨씬 더 고도로 보존되는 것으로 밝혀졌다[참조: Hahn, et al., 1985]. 기타 연구 결과, pol 특이적 체액성 교차반응성 뿐만 아니라 상당한 서열 상동성이 HIV-1과 HIV-2 간에 존재하는 것으로 밝혀졌다[참조: Clavel, 1986; Guyader, 1987]. 부가적으로, 최근의 연구는 세포-매개된 반응 유도를 기대하면서, 엔벨로프 단백질과는 반대로 내부 바이러스성 단백질을 항원으로서 사용하는 것에 역점을 두고 있다.

본 발명의 또 다른 양태에서는, 표면 발현용으로 선별된 제2 HIV 항원으로서의 HIV 트랜스액티베이팅 단백질(Tat)가 제공된다. 문헌[참조: Li et al., 1995]에는 감염된 세포로부터 분리된 HIV-1 Tat가 T 세포에서의 아포프토시스(apoptosis)에 의한 세포 사멸을 유도할 수 있다고 기재되어 있다. 본래에는, HIV 바이러스로 감염된 세포만이 파괴되는 것으로 추정되었지만, 상기 리(Li, 1995)에 의해 제공된 나중의 연구 결과는 감염된 세포의 수가 실제적으로 상실된 T 세포의 수 보다 훨씬 더 적다는 놀라운 사실을 밝혀내었다. 직접적인 감염 이외의 무언가가 T 세포 사멸 우세에 책임이 있다. tat 단백질을 선택하는데 있어서의 한 가지 부가적인 희망은 이러한 백신에 의해 유도된 어떠한 항체도, 상기와 같이 분리된 Tat를 중화시킴으로써 감염되지 않은 T 세에 대한 보호를 제공할 수 있다는 것이다. 항원으로서의 Tat의 분비를 유발시키는 또 다른 긍정적인 요인은 헬퍼(helper) T 세포 에피토프의 동정이다[참조: Blazevic, 1993].

추가로, 본 발명의 또 다른 양태에서는, HIV 백신 작제를 위한 모델 시스템이 제공된다. 지방단백질-OmpA 융합을 위한 유전 서열을 사용하여, HIV-1 역전사효소와 HIV-1 tat에 대한 유전자를 삽입하여 표면 발현되도록 한다. 이들 작제물은 유도를 요구하지 않는 누설되는(leaky) 프로모터인 지방단백질 프로모터 시스템의 조절하에 있다. 이는 상기 세균성 벡터가 포유류에게 투여되기 때문에 중요한 요인이며, 단백질 발현의 유도는 선택 사항이 아닐 것이다.

본 발명의 또 다른 양태에서는, 재조합 플라스미드를 전기천공시킨, 약독화된 살모넬라 티피무름(Salmonella typhimurium) 균주, SL 3261이 제공된다. 발현 실험을 반복하고, 추가의 연구를 수행하여 발현된 HIV 단백질의 위치를 결정한다. 특정하게는, 슈크로즈 구배를 이용하여 세균성 내막 및 외막을 분리하고 분획을 웨스턴 블롯팅한다.

추가로, 본 발명의 또 다른 양태에서는, 상기 재조합 플라스미드를 함유하는 SL3261로 이루어진 생 백신을 경구 투여한 BALB/c 마우스가 제공된다. 재조합 플라스미드나 PBS를 전혀 투여하지 않으면서 상기 역전사효소 또는 tat 생 백신, SL3261을 마우스에게 경구 공급한다. 백신 접종을 0일, 14일 및 28일째에 수행한다.

본 발명의 또 다른 양태에서는, 연구 기간 내내 매주마다 분노 샘플을 수집하고 이를 대상으로 하여 역전사효소 또는 tat에 특이적인 IgA에 대해 검정하는, BALB/c 마우스에서의 일련의 백신 접종 검정법이 제공된다. 21일과 85일째에, 동물을 희생시키고 비장 세포를 분리한다. 임파구를 대상으로 하여 증식성 반응 또는 사이토킨 수준을 측정함으로써 펠퍼 T 세포 활성화에 대해 검정한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 기술 분야 내에서 통상적인 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 다음 문헌에 보다 상세히 기재되어 있다[참조: 예를 들면, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach", Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells and Enzymes" [IRL Press. (1986)]; B.Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)].

따라서, 본원에 제시되는 경우, 다음 용어는 다음에 열거된 의미를 나타낸다.

"백터"는 부착된 세그먼트의 복제를 유발시키도록 또 다른 DNA 세그먼트가 부착될 수 있는, 플라스미드, 파아지 또는 코스미드 등의 레플리콘(replicon)이다.

"DNA 분자"는 일분체 형태 또는 이분체 나선 형태의 데옥시리보뉴클레오티드(아데닌, 구아닌, 티민 또는 시토신)의 중합체성 형태를 지칭한다. 이러한 용어는 상기 분자의 1차 및 2차 구조만을 지칭하는 것이고 이를 특정한 어떠한 3차 형태로 제한하지는 않는다. 따라서, 이 용어는 특히 선형 DNA 분자(예를 들면, 제한 단편), 바이러스, 플라스미드 및 염색체에서 발견된 이분체 DNA를 포함한다. 상기 구조를 논의하는데 있어서, 본원에서는 전사되지 않은 DNA 쇠(즉, mRNA와 상동성인 서열을 갖는 쇠)를 따라 5'에서 3' 방향의 서열만을 제공하는 통상적인 규칙에 따른다.

"복제 기점"은 DNA 합성에 관여하는 DNA 서열을 지칭한다.

DNA "암호화 서열"은 적당한 조절성 서열의 조절 하에 놓여지는 경우에 생체내에서 전사되고 특정 폴리펩티드로 해독되는 이분체 DNA 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5'(아미노) 말단에서의 출발 코돈과 3'(카복실) 말단에서의 해독 정지 코돈에 의해 결정된다. 암호화 서열에는 원핵성 서열, 진핵성 mRNA로부터의 cDNA, 진핵성(예를 들면, 포유류) DNA로부터의 게놈성 DNA 서열, 및 심지어 합성 DNA 서열이 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리아데닐화 시그널 및 전사 종결 서열이 통상적으로 암호화 서열의 3'에 위치할 것이다.

전사 및 해독 조절 서열은 숙주 세포에서 특정 암호화 서열의 발현을 제공해주는, 프로모터, 인핸서(enhancer), 폴리아데닐화 시그널, 터미네이터(terminator) 등의 DNA 조절성 서열이다.

"프로모터 서열"은 특정 세포에서 RNA 폴리머라제를 결합시킬 수 있고 하단(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절성 영역이다. 본 발명을 규정하기 위해서는, 상기 프로모터 서열이 3' 말단에서 전사 개시 부위에 의해 결합되어 있고 상기 배경을 담지할 만한 수준에서 전사를 개시하는데 필요한 최소 수의 염기 또는 요소를 포함하도록 상단(5' 방향)으로 연장된다. 이러한 프로모터 서열 내에서, 전사 개시 부위(뉴클레아제 S1로 맵핑함으로써 편리하게 정의된다) 뿐만 아니라 RNA 폴리머라제의 결합에 책임이 있는 단백질 결합 도메인(컨센서스 서열)이 발견될 것이다. 진핵성 프로모터는 항상은 아니지만 종종, "TATA" 박스와 "CAT" 박스를 함유할 것이다. 원핵성 프로모터는 -10 및 -35 컨센서스 서열 이외에도 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열을 함유한다.

"발현 조절 서열"은 또 다른 DNA 서열의 전사와 해독을 조절하는 DNA 서열이다. 암호화 서열은 RNA 폴리머라제가 암호화 서열을 mRNA 내로 전사시킨 다음 이러한 암호화 서열에 의해 암호화된 단백질로 해독시키는 경우에 특정 세포에서 전사 및 해독 조절 서열의 "조절 하에" 있다.

"시그널 서열"은 암호화 서열 전에 포함될 수 있다. 이러한 서열은 폴리펩티드가 세포 표면을 지시하거나 이러한 폴리펩티드가 매질 내로 분비되도록 숙주 세포에게 전달하는, 폴리펩티드에 대해 N-말단인 시그널 펩티드를 암호화한다. 이러한 단백질이 분비되는 경우, 상기 시그널 펩티드는 상기 단백질이 세포를 떠나기 전에 숙주 세포에 의해 잘려진다. 시그널 서열은 원핵 생물과 진핵 생물에 본래 존재하는 각종 단백질과 연합해서 발견될 수 있다.

본 발명의 프로브를 지칭하는데 있어서 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "올리고뉴클레오티드"는 2개 이상, 바람직하게는 8개 이상의 리보뉴클레오티드로 구성된 분자로서 정의된다. 이의 정확한 크기는 궁극적인 기능 및 올리고뉴클레오티드의 용도와 같은 많은 인자에 따라서 결정될 것이다.

본원에서 사용된 바와 같은 용어 "프라이머"는 핵산 쇠에 상보적인 프라이머 연장 생성물의 합성이 유도되는 조건 하에 놓여지는 경우, 즉 뉴클레오티드 및 DNA 폴리머라제 등의 유도제의 존재하에서 적합한 온도 및 pH 하에 놓여지는 경우, 합성 개시점으로서 작용할 수 있는, 정제된 제한 분해물에서와 같은 천연 상태 또는 합성적으로 제조된 상태 모두의 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 이러한 프라이머는 일분체 또는 이분체일 수 있으며 유도제의 존재하에서 목적하는 연장 생성물의 합성을 개시하기에 충분히 길어야만 한다. 이러한 프라이머의 정확한 길이는 온도, 프라이머의 공급원 및 사용 방법을 포함한 많은 인자에 따라서 결정될 것이다. 예를 들면, 진단적으로 적용되기 위해서는, 표적 서열의 복합성에 따라서, 올리고뉴클레오티드 프라이머가 전형적으로 15 내지 25개 이상의 뉴클레오티드를 함유하지만, 이 보다 적은 뉴클레오티드를 함유할 수도 있다.

본원에서의 프라이머는 특정한 표적 DNA 서열의 상이한 쇠에 "실질적으로" 상보적이 되도록 선택된다. 이는 상기 프라이머가 이들의 각각의 쇠와 하이브리드화하기에 충분히 상보적이어서야 한다는 것을 의미한다. 따라서, 프라이머 서열이 주형의 정확한 서열을 반영할 필요는 없다. 예를 들면, 비-상보적 뉴클레오타이드 단편을 상기 프라이머의 5' 말단에 부착시킬 수 있는데, 나머지 프라이머 서열은 쇠에 상보적이다. 또 다른 방법으로는, 비-상보적 염기 또는 그 이상의 서열을 프라이머 내로 산재시킬 수 있는데, 단 프라이머 서열은 상기 서열과 충분한 상보성을 지녀야 하거나 이들과 하이브리드화됨으로써 연장 생성물 합성용 주형을 형성해야 한다.

본원에서 사용된 바와 같은 용어 "제한 엔도뉴클레아제" 및 "제한 효소"는 각각 특이적 뉴클레오타이드 서열에서 또는 그 근처에서 이분쇄 DNA를 절단시키는 세균성 효소를 지칭한다.

특정 세포는 외인성 또는 이종 DNA가 이러한 세포 내부로 도입되는 경우에 이러한 DNA에 의해 "형질 전환"된다. 형질전환성 DNA는 상기 세포의 게놈 내로 통합(공유 결합)되거나 통합되지 않을 수 있다. 예를 들면, 원핵 생물, 효모 및 포유류 세포에서는, 형질전환성 DNA가 플라스미드와 같은 에피솜성 요소 상에 유지될 수 있다. 진핵성 세포에 관해서 언급하면, 안정하게 형질전환된 세포는, 형질전환성 DNA가 염색체 내로 통합되어 이 것이 염색체 복제를 통하여 낭(daughter) 세포에 의해 유전된 것이다. 이러한 안정성은 형질전환성 DNA를 함유하는 낭 세포 집단으로 구성된 세포주 또는 클론을 정착시키는 진핵성 세포의 능력에 의해 입증된다. "클론"은 단일 세포 또는 유사분열에 의한 공통의 조상로부터 유도된 세포 집단이다. "세포주"는 많은 세대 동안 시험관내에서 안정한 성장을 이룰 수 있는 1차 세포의 특정 클론이다.

두 DNA 서열은 규정된 길이의 상기 DNA 서열 전반에 걸쳐 뉴클레오타이드 매치율이 약 75% 이상(바람직하게는 약 80% 이상, 가장 바람직하게는 약 90 또는 95% 이상)인 경우에 "실질적으로 상동성"이다. 실질적으로 상동성인 서열은 서열 데이터 은행에서 입수 가능한 표준 소프트웨어를 사용하여 서열을 비교함으로써 동정하거나, 또는 예를 들면, 특정한 시스템에 대해 규정된 바와 같은 엄격한 조건 하에서 서던(Southern) 하이브리드화 실험에서 동정할 수 있다. 적당한 하이브리드화 조건을 규정하는 것은 본 발명의 기술 범위내이다[참조: Maniatis et al., supra; DNA Cloning, Vols. I & II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra].

DNA 작제물의 "이종" 영역은 천연에서 보다 큰 분자와 연계해서는 발견되지 않는 보다 큰 DNA 분자 내에서 동정될 수 있는 DNA 세그먼트이다. 따라서, 이러한 이종 영역이 포유류 유전자를 암호화하는 경우, 이러한 유전자는 통상적으로 공급원 유기체의 게놈 내의 포유류 게놈성 DNA를 플랭킹하지 않는 DNA에 의해 플랭킹될 것이다. 또 다른 예에서는, 암호화 서열이 암호화 서열 그 자체는 천연에서 발견되지 않는 작제물이다(예를 들면, 게놈성 암호화 서열이 인트론, 또는 본래의 유전자 이외의 상이한 코돈을 갖는 합성 서열을 함유하는 cDNA). 대립유전자성 변이 또는 천연 돌연변이 사건은 본원에서 정의된 바와 같은 DNA의 이종 영역을 생기게 하지 못한다.

이들 연구에 가장 통상적으로 이용된 표지는 방사성 원소, 효소, 자외선에 노출될 때 형광을 나타내는 화학물질 등이다. 수 많은 형광성 물질이 공지되어 있고 표지로서 이용될 수 있다. 이들로는, 예를 들면, 플루오레세인, 로다민, 아우라민, 텍사스 레드, AMCA 블루 및 루시퍼 엘로우가 있다. 특정한 탐지용 물질은 고우트(goat)에서 제조되고 이소티오시아네이트를 통하여 플루오레세인과 접합된 항-래빗 항체이다.

효소 표지도 마찬가지로 유용하며, 이는 현재 이용되고 있는 열량법, 분광법, 형광분광법, 전류적정법 또는 기체정량법 중의 어떠한 기술에 의해서도 탐지될 수 있다. 상기 효소를 카보디이미드, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드 등의 결합성 분자와 반응시킴으로써 선택된 분자에 접합시킨다. 이들 과정에 사용될 수 있는 많은 효소가 공지되어 있고 이용될 수 있다. 바람직한 것은 퍼옥시다제, β -글루쿠로니다제, β -D-글루쿠코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 글루코즈 옥시다제 + 퍼옥시다제 및 알칼린 포스타제이다. 미국 특허 제3,654,090호, 제3,850,752호 및 제4,016,043호가 대체 표지화 물질 및 방법에 관한 명세서의 예로써 지칭된다.

본 발명은 표면 노출에 요구되는 유전자와 사람 면역결핍 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드를 포함하는 사람 면역결핍 바이러스(HIV)용 생 백신에 관한 것이다. 표면 노출에 요구되는 유전자의 대표적인 예가 이. 콜라이 외막 단백질 ompA의 일정 부분에 연결된 이. 콜라이 지방단백질 시그널 서열을 암호화하는 유전자이다. 사람 면역결핍 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자의 대표적인 예는 역전사효소 및 트랜스액티베이팅 단백질로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

바람직하게는, 상기 재조합 플라스미드는 약독화된 세균성 숙주 내로 전기천공된다. 약독화된 세균성 숙주의 대표적인 예가 살모넬라 티피움균 균주, SL3261이다.

본 발명은 사람 면역결핍 바이러스 항원에 특이적인 면역 반응 생성 치료를 필요로 하는 개개인에게 청구된 백신을 투여하는 단계를 포함하여, 이러한 치료를 필요로 하는 개개인에게서 사람 면역결핍 바이러스 항원에 특이적인 면역 반응을 생성시키는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 목적하는 면역 반응은 점막성 IgA 반응, 헬퍼 T 세포 반응 및 세포독성 T 임파구 반응을 포함한다.

본 발명의 백신은 바람직하게는 경구 투여한다. 바람직하게는, 이러한 백신을 약 10^{12} 내지 약 10^{14} CFU(콜로니 형성 단위)로 투여한다.

실시예

다음 실시예는 본 발명의 각종 양태를 예시할 목적으로 제공된 것이지만 어떠한 형식으로든 본 발명을 제한하지 않는다.

실시예 1

역전사효소-ompA 작제물의 클로닝

역전사효소 유전자를 함유하는 플라스미드 pKRT2를 NIH AIDS 리전트뱅크로부터 취득한다. lpp-ompA의 융합 단백질 작제물에 대한 유전자를 함유하는 제2의 플라스미드 pTX101을 닥터 씨 에르하르트(Dr. C. Earhart; the University of Texas at Austin)로부터 취득한다. 제3의 플라스미드인 pSP72를 프로메가(Promega)로부터 취득한다. 먼저, pKRT2 플라스미드로부터의 역전사효소 유전자를 pSP72 플라스미드 내로 옮긴 중간체 플라스미드 pSP72-RT를 작제한다. pKRT2 내에 함유된 역전사효소 유전자를 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 변형시켜, 역전사효소 유전자를 플라스미드 pSP72 내로 삽입시켜 주는 신규한 제한 부위를 함유하도록 한다. 플라스미드를 BamHI 및 HindIII로 분해시키고, 1% 아가로즈 겔 상에서 수행하여 정확한 클론에 대해 스크리닝한다.

클로닝에서의 두번째 단계는 지방단백질 프로모터 및 지방단백질-ompA 서열을 역전사효소 유전자 전방에 삽입시키는 것을 포함한다. 이러한 지방단백질 프로모터 및 지방단백질-ompA 융합 서열은 본래 pTX101 플라스미드 내에 존재하는 것이다. 지방단백질-ompA 서열을 pSP72-RT 플라스미드 내로 삽입하기 위하여, 상보적인 제한 부위가 요구된다. pSP72-RT 플라스미드 상의 HindIII 부위를 지방단백질-ompA 서열에 대한 제한 부위로서 선택한다. GIBCO 라이프 테크놀로지(Life Technologies)로부터 PCR 프라이머를 주문하여, 주형으로서 pCR11-지방단백질-ompA 플라스미드를 사용하여 어느 한 말단 상에 HindIII 부위를 갖는 지방단백질-ompA 서열을 증폭시킨다. 1:10으로 희석된 주형 DNA 1 μ l, 각 프라이머 1 μ l, 및 PCR 슈퍼믹스(GIBCO Life Technologies) 45 μ l를 함유하는 반응물을 설정한다.

PCR 생성물 및 정제된 플라스미드 pSP72-RT를 HindIII 2 μ l 및 REact 2 완충액(LifeTechnologies) 2 μ l을 함유하는 20 μ l 반응액 중에서 37 $^{\circ}$ C 하에 밤새 HindIII(LifeTechnologies)로 분해한다. 이러한 PCR 생성물을 분해 후 겔 정제시킴으로써 정제하고, 에탄올 침전시킨 다음, 물 5 μ l에 재현탁시킨다.

분해 후, 상기 벡터를 탈포스포릴화시켜, 벡터가 단지 삽입물과만 연결되고 스스로와 바로 다시 연결되지 않도록 한다. 이를 위하여, 벡터를 에탄올 침전시키고 물 17 μ l, 10X 완충액 2 μ l 및 새우 알칼린 포스파타제(United States Biochemical) 1 μ l에 재현탁시킨다. 이 반응물을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 정치시켜 둔다. 이어서, 온도를 15분 동안 65 $^{\circ}$ C로 증가시켜 상기 포스페이트를 불활성화시킨다. 이어서, 상기 벡터를 페놀/클로로포름 추출시키고, 에탄올 침전시키며, 일정 분획을 겔 상에서 수행하여 농도를 결정한다.

벡터 0.1pmol 및 삽입물 0.5pmol을 사용하여 연결 반응물을 설정한다. 반응 용적은 10 μ l이고, T4 리가제 완충액 2 μ l(33 μ l 1M 트리스-Cl pH 8, 5 μ l 1M MgCl₂, 5 μ l 1M DTT, 5 μ l 0.1M ATP, 1.25 μ l 20mg/ml BSA(소의 혈청 알부민), 100 μ l가 되도록 하는 물), T4 리가제 1ml, 및 상기 벡터 및 삽입물을 함유한다. 반응물을 16 $^{\circ}$ C에서 밤새 정치시켜 둔다. 그 다음날, 연결 혼합물을 1:5로 희석시키고, 이를 사용하여 DH5 α 세포를 전기천공시킨다. 전기천공 후, 상기 세포를 LB amp 플레이트 상에 도말하고 밤새 배양한다. 콜로니를 크래킹시킴으로써 스크리닝하고, 추가 스크리닝을 위해, 1% 아가로즈 겔 상에서 대조군 보다 훨씬 더 많이 수행된 플라스미드를 선별한다. 이들 배양물을 밤새 성장시키고, 상기 플라스미드를 QIAgen 프랩 키트를 사용하여 정제한다. 정제된 플라스미드를 HindIII로 분해하여, 지방단백질-ompA가 삽입되었는지를 결정한다. 단지 하나의 제한 부위만을 사용하였기 때문에, 상기 유전자를 후방 또는 전방으로 삽입할 수 있다. 플라스미드가 정확한 전방 방향으로 유전자를 함유하였는지를 결정하기 위하여, XbaI 및 XhoI를 사용하여 부가의 분해를 수행한다. 지방단백질-ompA 단편을 정확하게 삽입시킨 경우에는, 300bp의 단편이 생성될 것이다. 이러한 단편을 후방으로 삽입시킨 경우에는, 이로써 생성된 단편의 크기가 450bp일 것이다. 정확하게 배향된 플라스미드를 동정한 후, 배양물을 성장시키고 -80 $^{\circ}$ C에서 글리세롤과 함께 동결시킨다. 이로써 생성된 플라스미드를 pHART라 칭한다.

정제된 플라스미드를 확인하기 위하여, 이를 오스틴 소재의 텍사스 대학에 있는 서열화 연구실에 보낸다. 서열화 반응물을 만들기 위하여, 프라이머 2 μ l, DNA 1 μ l 및 물 9 μ l를 1.5ml 튜브에서 합한다. 사용된 프라이머는 이들 서열이 pSP72 플라스미드 상에서 발견되었기 때문에 T7 및 SP6(Promega)이다.

실시예 2

트랜스액티베이팅(Tat) 단백질-Lpp-ompA 작제물의 클로닝

lpp-ompA-HIV-1 Tat의 융합 단백질을 생성시키는 유전 서열을 함유하는 벡터를 작제하기 위하여, 플라스미드 pTAT를 함유하는 DH5a의 글리세롤 스톱으로서 공급된, Tat 단백질에 대한 유전자를 NIH AIDS 리전트뱅크로부터 취득한다. 플라스미드 pTAT는 이. 콜라이에 의해 바람직한 코돈을 함유하도록 유전공학적으로 처리된 288bp tat 서열을 함유하고 있다. tat 유전자를 상기 유전자에 대한 5'에서 HindIII 부위에 의해 플랭킹시킨 다음, EcoRI 부위에 의해 플랭킹시킨다. 주채로 선별된 플라스미드인 pSP72는 다중 클로닝 영역에 이들 제한 부위 모두를 함유하고 있기 때문에, PCR에 의한 어떠한 대체물도 필요하지 않다. 첫번째 단계는 tat 유전자를 벡터 내로 삽입하여 중간체 플라스미드 pSP72-Tat를 작제하는 것이다.

pTAT 플라스미드를 함유하는 이. 콜라이의 배양물을 밤새 성장시키고, pSP72 플라스미드를 함유하는 이. 콜라이의 제2의 배양물을 성장시키는데, 이들 모두는 100 μ g/ml 앰피실린을 함유하는 LB 배지에서 성장시킨다. 프로메가 워자드 프랩 키트를 사용하여, 이들 배양물로부터 목적하는 플라스미드를 정제한다. 이어서, 플라스미드 DNA를 다음 반응물에서 HindIII 및 EcoRI 제한 엔도뉴클레아제(Promega)로 분해한다: DNA 20 μ l, 물 20 μ l, 10X 멀티-코어 완충액(Promega) 5 μ l 및 각 효소 2.5 μ l. 상기 반응물을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한다. 이어서, 상기 분해물을 1% 아가로즈 겔 상에서 수행한다. pTAT 분해물로부터의 300bp tat 밴드를, 분해된 pSP72벡터에 상응하는 2.4kb 밴드와 같이 면도날을 이용하여 겔로부터 절단한다. 이 모두를 프랩-A-유전자 키트(공급처: BioRad)를 사용하여 아가로즈로부터 정제한다. 이어서, 겔 정제된 DNA를 에탄올 침전시켜 부가의 모든 염을 제거하고, 물 10 μ l에 재현탁시킨 다음, 연결 반응물에 사용한다. 이 연결 반응물은 다음과 같이 만든다: 분해된 pSP72 3 μ l, 분해된 pTAT 4 μ l, 0.1M ATP 1 μ l, 5X 연결 완충액(LifeTechnologies) 4 μ l, T4 DNA 리가제(LifeTechnologies) 1 μ l, 및 물 7 μ l. 이 연결물을 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 밤새 배양한다. 이어서, 연결 반응물을 에탄올 침전시키고 물 10 μ l에 재현

탁시킨다. 이와 같이 농축된 DNA를 사용하여 이. 콜라이 DH5 α 세포를 전기천공시킨다. 이와 같이 전기천공된 세포를 100 μ g/ml 앰피실린을 함유하는 LB 한천 플레이트 상에 도말한다. 상기 플레이트로부터의 5개 콜로니를 스크리닝하여 이들이 정확한 삽입물을 함유하고 있는지를 결정한다. 이들 콜로니를 5ml 배양액에서 밤새 성장시키고, 플라스미드 DNA를 위자드 프랩 키트를 사용하여 분리한다. 이어서, 상기 DNA를 HindIII 및 EcoRI로 분해한다. 이중 몇개의 콜로니는 상기 분해물을 1% 아가로즈 겔 상에서 수행한 경우에 300bp의 삽입물을 나타내었다. 이러한 신규의 재조합 플라스미드는 pSP72-Tat로 불린다. 적당한 삽입물을 함유하는 이들 배양물 중의 하나를 글리세롤 스톱으로 만들고 이를 -80 $^{\circ}$ C에서 저장한다.

상기 작제물에서 두번째 단계를 완료시키고 지방단백질 프로모터와 지방단백질-ompA 서열을 트랜스액티베이팅(tat) 유전자 앞에 가하기 위해서, 역전사효소 작제물에 대해서와 동일한 접근법을 사용한다. 이어서, 정제된 플라스미드 pHAT를 확인하기 위하여, 이를 오스틴 소재의 텍사스 대학에 있는 서열화 연구실에 보낸다.

실시예 3

이. 콜라이에서의 역전사효소 작제물의 발현

밤새 배양시킨 대조군 DH5 α 및 DH5 α -pHART의 3ml 배양물을 37 $^{\circ}$ C하에 진탕시키면서 LB 배지에서 성장시킨다. 대조군 세포를 평편한 LB 배지에서 성장시키고, 이 동안에 역전사효소 함유 세포를 앰피실린 500mg/ml를 함유하는 LB 배지에서 성장시킨다. 그 다음날, LB amp 또는 LB 10ml를 이들 밤새 배양시킨 배양물 200ml에 접종하고 4시간 동안 성장시킨다. 이때, DH5 α -pHART 배양물 5ml를 꺼내고 이를 0.1M IPTG(이소프로필 β -D-티오갈락토피라노시드) 50ml를 함유하는 신선한 튜브에 놓아둔다. 상기 세포를 2.5시간 더 성장시킨다. 대조군 유도된 DH5 α -pHART 및 유도되지 않은 DH5 α -pHART 배양물 1ml 분취량을 꺼내고 이를 완전한 프로테아제 억제제(Boehringer Mannheim) 40ml의 존재하에 펠릿팅한다. 세포 펠릿을 물 60ml, 프로테아제 억제제 40ml, 및 DTT를 함유하는 2X SDS 트리스-글리신 샘플 완충액(Novex) 100ml에 재현탁시킨다.

샘플을 5분 동안 비등시킨 다음, 80 $^{\circ}$ C에서 동결시킨다. 샘플을 해동시키고 다시 5분 동안 비등시킨 다음, 노박스 10% 트리스-글리신 SDS 겔 상으로 부하한다. 전압을 125볼트로 설정하고 겔을 2시간 동안 수행한다. 이 샘플을 겔 상으로 부하하여 절반 양쪽이 대칭이 되도록 한다. 겔 수행을 완료한 경우, 이를 반으로 절단하고 절반 양쪽을 56mAmps에서 1시간 동안 PVDF 막으로 옮긴다. 옮긴 후, 상기 막을 건조시키고 밤새 정치시켜 둔다.

그 다음날, 막을 메탄올에 침지시켜 습윤시킨 다음, 아미도 블랙으로 염색시켜 단백질 전이를 확인한다. 이와 같이 염색된 PVDF 막을 사진 복사한다. 이어서, 상기 막을 탈염색하고 진탕기 상에서 1시간 동안 PBS 중의 3% BSA(소의 혈청 알부민)으로 차단시킨다. 이와 같이 차단시킨 후, 상기 막을 대상으로 하여, 1차 항체로의 블롯팅 준비를 한다. 막 1을 각 항체에 대해 1:2000의 희석율로 4 모노클로날 항-역전사효소 항체의 각테일과 함께 배양한다. 막 2는 1:5000 희석율의 친화성 정제된 폴리클로날 항-역전사효소 항체와 함께 배양한다. 양 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 세척 완충액[0.05% 트윈-20을 갖는 PBS 중의 3% BSA(소의 혈청 알부민)] 10ml에 희석시킨다. 상기 1차 항체와 1시간 동안 배양한 후, 세척 완충액으로 매번 5분 동안 6회 세척한다. 2차 항체를 10ml 세척 완충액에서 1:20,000으로 희석시킨다. HRP로 표지된 고우트 마우스 항체를 상기 모노클로날 1차 항체를 갖는 막 1에 사용하고, HRP로 표지된 고우트 안티-라비트 항체를 상기 폴리클로날 항체를 갖는 막 2에 사용한다. 상기 막들을 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양한다. 이러한 배양 후, 상기 막을 사르코실(Sarkosyl) 완충액(50mM 트리스-Cl, pH 7.5, 1M NaCl, 5mM EDTA, 0.4% 사라코실)로 매회 10분 동안 5회 세척한다. 이어서, 상기 막을 물로 세척하고 암실에 운반하면서 물 약 10ml에 정치시켜 둔다. 상기 막들을 습윤 상태로 유지하는 것이 매우 중요하다. 루미노/인핸서 용액 5ml를 안정한 퍼옥시드 용액 5ml와 혼합함으로써 슈퍼시그널(Pierce)을 제조한다. 암실에 놓아두면, 물을 상기 막으로부터 제거하고, 슈퍼시그널 혼합물을 가하고 3 내지 5분 동안 배양한다. 이어서, 상기 막을 상기 용액으로부터 꺼내고 이를 플라스틱 웹 조각 위에 놓아둔 다음, 접어 막을 덮는다. 하이퍼필름(Hyper film)-MP(Amersham) 조각을 절단하여 고정시키고, 막을 상기 필름에 15 내지 30초 동안 노출시킨다. 노출시킨 후, 상기 필름을 즉시 현상한다.

역전사효소 단백질이 이. 콜라이에서 발현되는 것으로 밝혀지면, 융합 단백질이 외막에 국재되어 있는지를 결정해주는 실험을 수행한다. 조약한 막 제제를 수행하여 전체 막 분획으로부터 외막 분획을 분리한다. 이들 상이한 분획을 웨스턴 블롯에 의해 검정하여 역전사효소 융합 작제물이 국재하는 위치를 결정한다. 웨스턴 블롯을 앞서 기재된 바와 같이 수행한다.

실시예 4

이. 콜라이에서의 트랜스액티베이팅 단백질(Tat) 작제물의 발현

Tat 작제물에 대한 발현 실험과 웨스턴 블롯을 역전사효소 세포에 대한 것과 매우 유사한 프로토콜로 수행한다. 한 가지 상이한 점은 환원제로서 DTT를 사용하는 것 대신, b-머캅토에탄올을 2X 노박스 트리스 완충액에 가한다는 것이다. 이 샘플을 또한 10 내지 20% 트리스 겔 상에서 수행한다. 사용된 1차 항체는 NIH AIDS 리전트뱅크로부터 수득되는 폴리클로날 항-tat 항체이고 1:1000 희석율로 사용된다.

실시예 5

살모넬라 SL3261에서의 역전사효소 작제물의 발현

정제된 pHART 플라스미드를 전기천공된 살모넬라 SL3261 내로 전기천공시킨다. 제한 분해물을 사용하여 플라스미드 흡수를 확인한다. SL3261에서의 모든 실험은 유도되지 않은 세포를 사용하여 수행한다.

보다 점성인 살모넬라 샘플을 겔 상으로 부하하기 위해서는, 먼저 DNA를, 처음에는 20게이지 니들을 통하여 그 다음에는 26게이지 니들을 통하여 위 아래로 피핑팅함으로써 전단시켜야 한다. 이어서, 샘플을

미소원심분리기에서 10,000rpm으로 10분 동안 원심분리시킨다. 역전사효소 샘플을 노박스 10% 트리스-글리신 겔 상으로 부하하고, 단백질 밴드를 분리한다. 겔 상으로 부하하기에 앞서 환원제를 상기 샘플에 전혀 가하지 않는 경우에 역전사효소에 대한 최상의 웨스턴 블롯이 수득된다. SL3261 샘플을 추가로 특징 확인하기 위하여 이용되는 한 가지 부가의 과정은 슈크로즈 구배를 이용하여 내막과 외막을 분리하는 것이다. 이러한 막 분획 분리 방법은 이. 콜라이 샘플에 대해 사용되는 조약한 막 제조 보다는 철저하다. 내막과 외막 분획이 대조군 SL3261과 pHART 플라스미드를 함유하는 SL3261 모두에 대해 수득되면, 이들 샘플을 SDS 겔 상에서 수행하고, 앞서 기재된 바와 같이 항-역전사효소 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검정한다.

실시예 6

살모넬라 SL3261에서의 트랜스액티베이팅 단백질(tat) 작제물의 발현

정제된 pHAT 플라스미드를 전기적격한 살모넬라 SL3261 내로 전기천공시키고, 플라스미드 흡수를 적당히 제한 분해에 의해 확인한다. 역전사효소 작제물 샘플을 사용하는 경우와 같이, 유도 실험을 수행하지 않는다.

상기 언급된 바와 동일한 방식으로 겔 부하하기 위한 샘플을 준비한 다음, 이를 10 내지 20% 트리스 겔 상에 부하한다. β-머캅토에탄올을 환원제로서 가한 경우에 Tat 샘플을 함유하는 레인에서 독특한 밴드가 웨스턴 블롯 상에 가시적으로 나타났다. 겔 상에 부하하기 전에 샘플이 환원되지 않는 경우에는, 상기 밴드가 Tat 웨스턴 블롯에서 사라질 것이다.

역전사효소 샘플을 사용하는 경우와 같이, 슈크로즈 구배를 이용하여 내막 및 외막 분리를 수행한다. 이들 샘플을 또한, 항-Tat 항체와 항-ompA 항체 모두를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검정한다. 항-Tat 항체를 사용한 경우에 높은 수준의 비-특이적 결합이 관찰되었기 때문에, 웨스턴 블롯은 극히 결정적이지 못하다. 항-ompA 항체를 웨스턴 블롯에 사용하는 경우에 보다 긍정적인 결과가 수득되었다.

실시예 7

IgA 및 증식 검정을 위한 백신 접종

백신의 효능을 시험하기 위하여, HIV 융합 작제물을 함유하는 약독화된 살모넬라 SL3261의 일정 용량을 마우스에게 공급한다. 점막성 및 헬퍼 T 세포 면역 반응을 모니터한다. 분노 샘플을 수집하고 항-역전사효소 IgA에 대해 검정함으로써 점막성 반응을 모니터하고, 증식 검정과 사이토킨 검정에 의해 헬퍼 T 세포 반응을 측정한다. 증식 검정은 비장 세포를 항원과 함께 배양한 다음 ³H-티미딘으로 스파이킹하는 것을 포함한다. 증식성이므로 상기 항원에 반응성인 세포는 반응성이 아닌 세포 보다 더 많은 방사능 티미딘을 흡수할 것이다. 세포를 수거하고 산정해 보면, 보다 높은 계수는 보다 증식성이므로 항원 인식성이라는 것을 지시해준다. 사이토킨 검정은 항원과 함께 배양된 세포로부터 상등액을 제거하는 것을 포함한다. 항원에 의해 자극되는 세포는 상이한 사이토킨을 상기 상등액 내로 분비할 것이다. 샌드위치 ELISA를 사용하여 IL-2 및 IL-10 수준을 측정할 수 있다. 높은 IL-2 수준은 헬퍼 T 세포 반응(T_{H2} 반응)을 지시하는 반면, 보다 높은 IL-10 수준은 세포독성 T 세포 반응(T_{H1} 반응)을 지시한다.

세균성 배양물을 경우에 따라 500µg/ml 앰피실린을 함유하거나 함유하지 않는 LB 배지 50ml에서 성장시킨다. 배양물을 37°C에서 22시간 동안 진탕시킨다. 세포를 5,000rpm으로 10분 동안 펠릿화한 다음, PBS 500µl에 재현탁시킨다. 30µl 분취량을 표지된 0.5ml 튜브에 놓아두고 공급될 때까지 얼음 상에 유지시킨다.

5주생 BALB/C 마우스를 잭슨 랩(Jackson Labs)으로부터 수득한다. 마우스를 10마리 4그룹으로 나누고 우리당 5마리씩 수용한다. 실험을 개시하기에 앞서 마우스를 2주 동안 방치시켜 둔다. 마우스에게 다음과 같이 백신 접종한다: 백신 접종하기 4시간 전에 음식과 물을 없앤다. 세균성 1회분을 투여하기 이전에, 마우스에게 6% 중탄산나트륨 10µl을 피펫 팁으로 공급한다. 10분 기다린 후에, 마우스에게 적당한 세균을 공급한다. R로 표지된 마우스 한 그룹에게 SL3261-pHART 20µl을 공급한다. T로 표지된 두번째 그룹에게 SL3261-pHAT 20µl을 공급한다. S로 표지된 세 번째 그룹에게 대조군 SL3261 20µl을 공급하고, C로 표지된 네 번째 그룹에게 PBS 20µl을 공급한다(표 1). 우리 R-1과 R-2에 수용된 R 그룹 마우스를 연구 기간 내내 앰피실린 상에 유지시킨다. 이는 플라스미드 안정성 문제점 때문이다. 1g/L 앰피실린을 함유하는 신선한 물을 매일 제공한다. C-2 우리의 마우스를 또한, 동일한 용량의 앰피실린 상에 유지시켜 면역 반응에 대한 항생제의 효과를 불가능하게 한다.

0일과 14일째에 모두 마우스에게 백신 1회 용량을 제공한다. 21일째, R, T, S의 한 우리, 및 각 C 우리, C-1 및 C-2로부터의 2마리 마우스를 3주 연구를 위해 희생시킨다. 28일째에 나머지 마우스에게 다시 투여하고, 85일째에, 12주 연구를 위해 마우스를 희생시킨다.

[표 1]

IgA 및 증식 연구를 위한 마우스 백신 접종 스케줄

	10 R 마우스	10 T 마우스	10 S 마우스	10 C 마우스
0일	20 μ l SL3261-역전사효소	20 μ l SL3261-Tat	20 μ l SL3261	20 μ l PBS
14일	20 μ l SL3261-역전사효소	20 μ l SL3261-Tat	20 μ l SL3261	20 μ l PBS
21일	5마리 마우스 희생됨	5마리 마우스 희생됨	5마리 마우스 희생됨	4마리 마우스 희생됨
28일	20 μ l SL3261-역전사효소	20 μ l SL3261-Tat	20 μ l SL3261	20 μ l PBS
85일	5마리 마우스 희생됨		5마리 마우스 희생됨	4마리 마우스 희생됨

실시예 8

IgA 검정을 위한 분뇨 펠릿의 수집

점막성 IgA 반응을 모니터하기 위하여, 각 마우스 우리로부터 매주 신선한 똥을 수집하고 이를 2ml 마이크로퓨지 튜브에 놓아둔다. PBS 1ml를 각 튜브에 가하고 샘플을 간헐적으로 와동시키면서 1 내지 2시간 동안 정치시켜 둔다. 샘플을 15분 동안 14,000rpm으로 원심분리시킨다. 상등액을 깨끗한 튜브로 꺼낸 다음 -80°C에서 저장한다.

IgA ELISA를 다음과 같이 수행한다: Nunc 96웰 폴리스티렌 플레이트를 PBS 50 μ l 중의 역전사효소 또는 Tat 200ng으로 밤새 예비-피복시킨다. 플레이트를 4°C에서 유지시키고, 촉촉한 종이 타월을 이용하여 플라스틱 웰 및 밀봉된 플라스틱 용기 내에서 웰핑한다. 그 다음날, 항원을 따라 부어 제거하고, 플레이트를 세척 완충액(PBS 중의 0.05% 트윈-20)으로 3회 세척한다. 이어서, 플레이트를 실온에서 PBS 중의 3% 소의 혈청 알부민 200 μ l로 2시간 동안 차단시킨다. 차단 단계 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척한다. 신선하게 희석된 재-원심분리된 샘플을 각 웰당 100 μ l로 가한다. 샘플을 PBS 중의 3% 소의 혈청 알부민에서 1:10 및 1:50으로 희석시킨다. 플레이트를 실온에서 2.5시간 동안 배양한다. 샘플 결합 후, 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한다. PBS 중의 3% 소의 혈청 알부민에서 1:500으로 희석된 고우트-항 마우스 IgA(Sigma, 홀스래디쉬 퍼옥시다제로 표지됨) 100 μ l 용적을 각 웰에 가한다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 배양한다. 이어서, 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척하고, ABTS(2,2'-아지노비스(3-에틸벤즈티아졸린 설펜산)) 100 μ l을 각 웰에 가한다. 충분한 색상 현상 후, 옥살산 100 μ l을 가함으로써 반응을 중지시킨다. 이어서, 바이올레드 플레이트 판독기 상에서 414nm하에 플레이트를 판독한다.

실시예 9

증식 검정 및 사이토킨 검정

멸균성 조건하에서 경부 탈구시킴으로써 마우스를 희생시킨다. 비장을 꺼내고 이를 2mM L-글루타민, 50 μ g/ml 젠타마이신, -50 μ M β -머캅토에탄올 및 10% 태내 송아지 혈청(LifeTechnologies)를 함유하는 RPMI 1640(LifeTechnologies) 3ml를 함유하는 60 x 15mm 페트리 디쉬에 놓아둔다. 소장을 꺼내고 이를 5ml 50mM EDTA, 2mg/ml 대두 트립신 억제제(Sigma)를 함유하는 멸균성 15ml 튜브에 놓아둔다. 간을 꺼내고 이를 PBS를 함유하는 멸균성 15ml 튜브에 놓아둔다. 간과 장기를 -80°C에서 동결될 때까지 얼음 상에서 유지시킨다.

가위와 경자를 사용하여 비장을 작은 조각으로 절단한다. 이어서, 5ml 시린지로부터 플런지의 평편한 상부를 이용하여 상기 디쉬의 바닥에 대하여 조직을 압착시킨다. 섬유상 조직만이 잔존할 때까지 이를 반복한다. 이어서, 현탁액을 끌어 올리고 19 게이지 니들을 통하여 수회 끌어 내린 다음 나일론 메쉬 스크린 내로 통과시키고 이를 얼음 상에서 멸균성 15ml 튜브에 놓아둔다. 페트리 디쉬를 부가의 RPMI-1640 4ml로 세정한 다음, 상기 15ml 튜브에 놓아둔다. 이러한 지적으로부터 볼때, 모든 비장 세포 샘플을 얼음 상에서 유지시킨다.

이어서, 비장 세포를 1250rpm에서 10분 동안 원심분리시키고 상등액을 제거한다. 나머지 적색 펠릿을 5ml 멸균성 용해 완충액(0.15mM NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH 7.4)에 재현탁시켜 적혈구를 용해시킨다. 비장 세포를 간헐적으로 진탕시키면서 실온에서 5분 동안 배양한다. 이러한 배양 기간 후, RPMI 배지를 가하여 튜브를 13ml가 되도록 채우고 샘플을 1250rpm에서 10분 동안 원심분리시킨다. 상등액을 경사 제거하고 세포를 매질로 다시 세척한다. 제2 세척 후, 백색 펠릿을 5ml RPMI, 10% 태내 송아지 혈청에 재현탁시킨다.

혈구계를 사용하여 모든 샘플을 계수한다. 각 웰-재현탁된 샘플로부터의 50 μ l을 트립판 블루 450 μ l에 가한다. 이 용액 1방울을 혈구계 위에 놓아두고, 블루 염료를 흡수하지 않은 살아 있는 세포를 계수한다.

대조군 마우스로부터의 세포가 항원 표시 세포로서 필요하므로, 미토마이신 C(Sigma)로 처리하여 증식을 억제시켜야 한다. 이러한 과정 전에, 대조군 세포 각 샘플의 일정 부분을 꺼내고 대조군 반응자 세포로서 사용되도록 챙겨둔다. 나머지 대조군 세포를 10분 동안 1250rpm으로 원심분리시킨다. 상등액을 제거하고 세포를 2ml의 멸균성 PBS/튜브에 재현탁시킨다. 2mg을 4ml의 PBS에 재현탁시키고 필터 멸균시킴으로써 미토마이신 C를 제조한다. 미토마이신을 함유하는 튜브를 알루미늄 호일로 싸서 어느 때든지 빛으로부터 보호한다. 세포 1ml당 미토마이신 용액 100 μ l 또는 튜브당 200 μ l를 가한다. 튜브를 알루미늄 호일로 싸고 37°C에서 20분 동안 배양한다. RPMI, 10% 태내 송아지 혈청을 샘플에 가하여 상기 튜브가 13ml가 되도록 채운다. 세포를 10분 동안 1250rpm으로 원심분리시키고 상등액을 경사 제거한다. 이 세척을 2회 더 반복한다. 이들 불활성화된 이펙터(effector) 세포 5ml 용적의 RPMI, 10% 태내 송아지

혈청에 재현탁시키고 앞서 기재된 바와 같이 혈구계를 사용하여 재계수한다. 배지에서 적절히 희석시킴으로써 모든 샘플을 농도가 1×10^6 세포/ml가 되도록 조정하고 도말을 위해 사용될 때까지 얼음 상에 유지시킨다.

증식 검정과 사이토킨 검정 모두를 위해, 플레이트를 동일한 방식으로 설정한다. 시험되는 항원은 10 μ g/ml 또는 50 μ g/ml 농도의 재조합 역전사효소 또는 Tat, 열 사멸된 SL3261 또는 RPMI이다. 열 사멸된 SL3261을 제조하기 위해서는, 배양물을 LB 배지에서 밤새 성장시킨다. 세포 2ml를 꺼내고, 이를 2ml 미소원심분리기 튜브에서 2시간 동안 65°C로 가열한다. 이어서, 상기 세포를 아래로 잡아 늘리고 2ml의 멸균성 PBS에 재현탁시킨다. 세포를 RPMI, 9ml의 RPMI 중의 1ml의 SL3261에서 1:10 희석물을 제조함으로써 검정에 사용한다.

적당하게 희석된 항원을 50ml 용적으로 각 웰에 가한다. 이어서, 1×10^5 이펙터 세포(미토마이신 C로 처리된 대조군 세포)를 100 μ l 용적으로 각 웰에 가한다. 이어서, 시험될 반응자 세포를 가하는데, 각 웰당 1×10^5 세포를 100 μ l 용적으로 가한다. 모든 샘플을 3벌씩 만든다. 플레이트를 덮고 37°C에서 5% CO₂와 함께 배양한다.

사이토킨 실험을 위해, 플레이트를 48시간 동안 배양한다. 이때, 상등액 150 μ l를 각 웰로부터 제거한다. 각 3벌로부터의 150 μ l 분취량을 10 μ l의 완전한(Complete™) 프로테아제 억제제(Boehringer Mannheim, 1정제/1ml 물)을 함유하는 0.5ml 튜브에서 합한다. 샘플을 ELISA에 사용될 때까지 -80°C에서 저장한다.

증식 실험을 위하여, 상기 플레이트를 3일 또는 5일 동안 배양한다. 세포를 수거하기 18시간 전에, 웰을 1mCi의 ³H-티미딘으로 스파이크한다. 방사능 티미딘(1 μ Ci/ μ l)를 다음과 같이 희석시킨다: ³H-티미딘 200 μ l를 RPMI 배지 3800 μ l에 가하면, 50 μ Ci/ml 농도가 생성된다. 이 희석물 20 μ l를 각 웰에 가하여 1 μ Ci/웰의 최종 농도가 되게한다. 상기 플레이트를 37°C 및 5% CO₂ 하의 배양기에 18시간 동안 재순환시킨다.

브랜델(Brandel) M-24 세포 수거기를 사용하여 왓만 유리 필터 상에 세포를 수집한다. 이어서, 필터를 에코노플루오르(Econofluor) 액체 신틸레이션 카테일을 사용하여 액체 신틸레이션 바이알에 놓아 두고 샘플을 벡크만(Beckman) LS6000SC 상에서 계수한다.

IL-2 및 IL-10의 농도를 결정하기 위한 인터루킨 ELISA를 기재된 바와 같이 수행한다.

실시에 10

본 발명은 HIV 항원을 약독화된 살모넬라 균주에서 표면 발현시켜 세포성 및 점막성 면역 반응 뿐만 아니라 체액성 반응을 유발시킴으로써 HIV용 모델 생 백신을 개발하는 것에 관해 기술하고 있다. 앞서 언급된 바와 같이, 중간체 플라스미드인 pSP72-RT 또는 pSP72-Tat를 먼저 삭제한 다음, 이를 Lpp-OmpA 서열 삽입용 주체로서 사용하면, 결국에는 목적하는 재조합 플라스미드 pHART(도 1) 또는 pHAT(도 2)가 생성된다.

양 플라스미드를 삭제하고 서열화하면, 융합 단백질의 발현을 먼저 이. 콜라이 DH5 α 에서 검정한다. 도 3은 이. 콜라이 DH5 α -pHART의 웨스턴 블롯의 영상이다. pHART 함유 세균으로부터의 샘플을 함유하는 레인에서 독특한 밴드가 관찰되었다. 재조합 플라스미드를 갖지 않는 대조군 이. 콜라이 DH5 α 를 함유하는 레인은 웨스턴 블롯 상에서 이들 밴드를 나타내지 않는다. 이들 독특한 밴드의 존재는 HIV 역전사효소 단백질의 발현이 실제로 일어나고 있다는 것을 지시해준다.

이. 콜라이 DH5 α -pHART의 샘플을 항-Tat 항체로 염색된 웨스턴 블롯에 의해 분석하는 경우에 유사한 결과가 수득되었다(도 5). 이러한 블롯에서는, pHAT를 함유하는 이. 콜라이에 대해 독특한 밴드가 관찰되었는데, 이는 대조군 이. 콜라이 레인에서는 나타나지 않는다. 대조군 이. 콜라이는 tat 유전자를 갖는 재조합 pHAT 플라스미드를 함유하고 있지 않다.

HIV 역전사효소 항원의 위치를 추가로 확인하기 위하여, 조약한 막 제조를 수행한다. 대조군 이. 콜라이로부터의 전체 막 샘플과 외막 샘플, 및 pHART 함유 이. 콜라이를 항-역전사효소 항체로 염색된 웨스턴 블롯을 이용하여 검정한다. 이러한 웨스턴 블롯의 결과가 도 4에 도시되어 있다. 이. 콜라이 DH5 α 의 완전한 세포 용해물에 존재하는 독특한 밴드가 전체 막 분획과 외막 분획 모두에 존재한다. 이러한 결과는 HIV 역전사효소가 이들 세균성 세포의 외막에 국재된다는 것을 지시해준다.

역전사효소와 tat 모두가 DH5 α 이. 콜라이 세포에서 검출될 수 있다는 것이 확립되기만 하면, 이때 재조합 플라스미드 pHART 및 pHAT를 약독화된 살모넬라 균주 SL3261 내로 형질전환시키고 이러한 융합 단백질의 발현을 확인한다. 폴리클로날 항-역전사효소 항체를 사용하여, 도 6에 도시된 바와 같이 SL3261-pHART의 웨스턴 블롯을 염색시킨다. 이. 콜라이를 사용하는 경우와 같이, 2개의 독특한 밴드가 살모넬라 샘플에 존재한다. 이러한 적당한 분자량의 독특한 밴드의 존재는 역전사효소 단백질의 발현이 실제로 일어나고 있다는 것을 지시해준다. 폴리클로날 항-Tat 항체를 사용하여 도 8에 도시된 바와 같이 SL3261-pHAT의 웨스턴 블롯을 염색한다. 독특한 밴드가 pHAT 플라스미드를 함유하는 레인에서만 관찰되었으며, 대조군 SL3261에서는 관찰되지 않았다. 이러한 밴드는 예상 분자량 보다 더 많이 지속되는데, 이는 SDS 중의 ompA 단백질과의 가용화 문제점에 따른 결과일 수 있다.

HIV 역전사효소를 살모넬라 시스템에 보다 잘 국재화시키기 위하여, 내막과 외막을 분리하고 이를 도 7에 도시된 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. pHART를 함유하는 세포의 외막 분획에서만 가시적인 단일 밴드는 이러한 역전사효소 단백질이 약독화된 살모넬라의 외막에 국재한다는 것을 지시해준다. pHAT를 함유하는 SL3261의 내막과 외막을 또한 분리한다. 웨스턴 블롯의 결과가 도 9에 도시되어 있다. pHAT를 함유하는 SL3261의 외막 분획에 존재하는 독특한 밴드는 SL3261-pHAT의 완전한 세포 용해물의 웨스턴에

서 관찰된 독특한 밴드와 동일한 분자량의 것인데, 이는 HIV Tat 단백질이 이들 세포의 외막에 대해 국재된다는 것을 제시하고 있다.

실시에 12

플라스미드 pHART 또는 pHAT을 함유하는 약독화된 살모넬라 균주 SL3261로 구성되는 상기와 같이 작제된 생 백신이 적당한 HIV 단백질을 발현하는 것으로 결정되지만 하면, 이들 세균을 이용하여 마우스에게 백신 접종한다. 2회 내지 3회 용량을 경구 투여한 후, 상기 마우스를 대상으로 하여 적당한 HIV 항원에 대한 면역 반응에 대해 검정한다.

첫번째 시리즈의 실험에서는, HIV 역전사효소(도 10) 및 HIV tat(도 11)에 대한 분비성 IgA 반응을 알알 아보기 위하여 상기 마우스를 검정한다. SL3261-pHART 또는 SL3261-pHAT로 백신 접종시킨 마우스에서만 특이적 IgA 반응이 관찰되는데, 이는 양 백신이 실제로 몇몇 특이적 IgA 반응을 유도한다는 것을 지지해 주지만, Tat 항원에 대한 Tat 백신을 사용하는 경우 보다, 역전사효소 항원에 대한 역전사효소 백신으로 백신 접종시킨 마우스에서 2배 이상 더 우수한 반응이 나타났다.

도 12는 시간에 따른 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스에서 수득된 역전사효소 특이적 IgA 반응의 그래프를 도시한 것이다. 이러한 반응은 처음 백신 접종한지 3주 후에 피크를 나타낸 후, 시간이 지남에 따라 떨어지는 것으로 보인다. 이러한 역전사효소 특이적 항체의 감소는 생 백신 작제물을 이용하는 경우에 종종 관찰되는 현상으로 설명할 수 있다. 마우스를 먼저 상기 생 백신으로 접종시킨 경우에는, 이들이 목적하는 항원(이러한 경우에는, 역전사효소) 뿐만 아니라 살모넬라에 대해서도 항체를 생성시킨다. 특이적 항원에 대한 면역 반응을 증가시키기 위한 추가의 용량은 덜 효과적일 수 있는데, 이는 마우스를 성공적으로 감염시킬 수 있는 살모넬라 수의 감소를 야기시키는 보다 높은 수준의 항-살모넬라 항체가 점막에 존재하기 때문이다[참조: Kraehenbuhl, 1992]. 이러한 보다 높은 수준의 항-살모넬라 항체는 본질적으로 백신 접종의 유효 용량을 보다 낮게 한다.

HIV 항원에 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 측정하기 위해 증식 검정을 수행한다. 짧은 3주간의 연구 결과, 높은 배경에도 불구하고, 이는 처음 백신 접종한지 3주 후에 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스에서 발현되는 역전사효소 특이적 반응인 것으로 여겨진다(도 13). Tat 항원에 대한 검정으로부터의 결과는 덜 유망한 것이다(데이터는 제시되지 않음).

도 14는 3주 연구에서 수행된 바와 같이 역전사효소 백신으로 초기 백신 접종한지 12주 후의 연구를 나타낸다. 여기서는, 상이한 마우스로부터 분리된 비장 세포에서 관찰되는 반응이 보다 현저하다. 역전사효소 작제물을 함유하는 SL3261로 백신 접종한 5마리 마우스 중에서 4마리는 비장 세포를 자극하기 위해 사용된 역전사효소 항원의 두 농도에 대해 양성 반응을 나타낸다. 5마리 마우스 모두는 비장 세포를 자극하기 위해 사용된 열-사멸된 살모넬라에 대해 양성 반응을 나타낸다. 이러한 살모넬라에 대한 양성 반응은 예상된 것인데, 이는 상기 마우스가 역전사효소 항원 뿐만 아니라 살모넬라 캐리어에도 노출되었기 때문이다. 비장 세포를 RPMI-1640 배지 단독과 배양하는 경우에 배경 수준의 증식을 나타내었다. 이들 결과는 HIV 역전사효소 항원을 발현시키는 생 백신으로 백신 접종되는 경우에는 이들 마우스가 역전사효소에 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 발현할 것이라는 것을 지지해주는 극히 긍정적인 것이다.

본 발명은 세포성 및 점막성 면역 반응 뿐만 아니라 체액성 반응을 생성시키도록 약독화된 살모넬라 균주에서 HIV 항원을 표면 발현시킴으로써 HIV에 대한 생 백신의 개발을 나타낸다. 생 백신 벡터용으로 약독화된 살모넬라 균주를 사용함으로써, 세포성 반응과 점막성 반응 모두를 유도할 수 있다.

본 발명의 백신을 개발하는데 있어서의 첫번째 단계는 약독화된 살모넬라 균주 내로 형질전환시키기 위한 두 플라스미드를 작제하는 것을 포함한다. 이들 플라스미드는 모두 이러한 단백질 작제물의 지속적인 발현을 허용해주는 *lpp* 프로모터의 조절 하에 *lpp-ompA* 융합 작제물을 함유하고 있다. 이러한 *lpp-ompA* 유전자는 HIV 역전사효소 단백질 또는 HIV tat 단백질에 대한 유전자 다음에 있다. 이러한 3조의 융합 작제물이 HIV 단백질을 상기 세균의 외부 표면 상에 발현시킬 수 있다.

이들 플라스미드를 작제한 후, HIV 단백질이 세균에서 발현되었는지를 결정한다. 이, 콜라이 균주에서의 발현을 탐지하는 방법을 개발하고 플라스미드를 약독화된 살모넬라 균주 내로 형질전환시킨다. 단백질 발현을 평가하고 이 단백질을 국재화시킨다. 생 백신을 대상으로 부가적으로 특징 확인한 후, 마우스에게 재조합 약독화된 살모넬라 1회분을 공급하고 이들의 면역 반응을 모니터링한다. 분뇨 IgA 수준을 측정함으로써 점막성 면역 반응의 생성을 평가하고, 증식 검정을 수행하고 사이토킨 수준을 측정함으로써 헬퍼 T 세포 반응을 검사한다.

재조합 플라스미드를 작제하는데 있어서, 첫번째 단계는 두 플라스미드를 작제하는 것인데, 이 중 하나는 *lpp* 프로모터의 조절 하에 *lpp-ompA* 융합 서열을 함유하고 그 다음에 HIV 역전사효소 유전자를 함유한다. 두번째 플라스미드는 동일한 *lpp-ompA* 융합 서열을 함유하고 그 다음에 HIV tat 단백질을 함유한다. 이들 플라스미드 각각을 주채로서 pSP72 플라스미드를 사용하여 작제한다. 이러한 다중 제한 분해물의 아가로즈 겔은 예상된 크기의 목적하는 단편을 나타낸다. 이들 재조합 플라스미드는 목적하는 *lpp-ompA* 유전자 단편 뿐만 아니라 적당한 HIV 유전자 서열을 함유하고 있다.

플라스미드가 작제되면, HIV 단백질이 세균성 시스템에서 발현되었는지를 제시한다. IPTG로 유도된 재조합 플라스미드와 유도되지 않은 재조합 플라스미드 모두를 함유하는 이, 콜라이의 완전한 세포 용해물, 뿐만 아니라 상기 플라스미드를 갖지 않는 대조군 이, 콜라이를 SDS 겔 상에서 수행하고, 이를 웨스턴 블롯팅을 위해 PVDF 막에 옮긴다. HIV 역전사효소 단백질을 웨스턴 블롯 상에서 탐지할 수 있다. 상기 막을 폴리클로날 항-역전사효소 항체로 염색시킨다. 재조합 pHART 플라스미드를 함유하는 이, 콜라이에만 존재하는 목적하는 분자량에서 2개의 독특한 밴드가 존재한다. 이 항원을 이, 콜라이로부터 정제한다.

유도된 세균성 세포 용량을 함유하는 샘플은 유도되지 않은 세균성 세포를 함유하는 샘플과 어떠한 상이성도 나타내지 않는다. 표면 발현용 재조합 플라스미드를 함유하는 세균은 대조군 세균과 같이 건강하

지 않은 것이며, 이러한 플라스미드는 극히 안정하지 못하다. 재조합 SL3261의 성장 속도는 대조군 SL3261의 성장 속도보다 더 느리다. 항생제를 사용하지 않고 성장된 SL3261 중의 pHAT의 플라스미드 안정율은 12%이다. SL3261 중의 pHAT의 플라스미드 안정율은 90%이다. 이러한 보다 느린 성장 속도와 플라스미드 불안정성 요인들은 유도시 관찰되는 단백질 발현량을 감소시킬 수 있다.

HIV 역전사효소 항원의 국재를 추가로 확인하기 위하여, 조악한 막 제제를 사용하여 외막을 전체 막 분획으로부터 분리시킨다. 이들 막 샘플을 항-역전사효소 항체로 염색시킨 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 이러한 웨스턴 블롯에서는, DH5 α 이. 콜라이의 완전한 세포 용해물에 존재하는 동일한 독특한 밴드가 전체 막 분획과 외막 분획 모두에 존재한다. 이러한 결과는 HIV 역전사효소가 이들 세균성 세포의 외막에 국재한다는 것을 지시해준다.

폴리클로날 항-tat 항체로 염색시킨, 재조합 플라스미드 pHAT, 유도된 및 유도되지 않은 HIV tat 유전자 및 대조군 이. 콜라이를 함유하는 완전한 세포 용해물의 웨스턴 블롯에서는, 상기 재조합 플라스미드를 함유하는 세균에 독특한 밴드가 나타났다. 항체의 몇몇 비-특이적 결합이 또한 항-tat 웨스턴 블롯에 존재한다. 마찬가지로, 단백질 발현 수준은 유도된 세균과 유도되지 않은 세균에서 서로 상이한 것으로 보이지는 않는다.

역전사효소와 tat 모두가 DH5 α 이. 콜라이 세포에서 탐지되었기 때문에, 재조합 플라스미드 pHAT 및 pHAT를 약독화된 살모넬라 균주 SL3261 내로 형질전환시킨다. 역전사효소 pHAT 플라스미드를 함유하는 SL3261을 사용하여 완전한 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 수행한다. 발현 탐지에 사용된 항체는 친화 정제된 폴리클로날 항-역전사효소이다. 이. 콜라이를 사용한 경우와 같이, 2개의 독특한 밴드가 상기 살모넬라 샘플에 존재한다. 이들 적당한 분자량의 독특한 밴드의 존재는 역전사효소 단백질의 발현이 일어났다는 것을 지시해준다.

HIV 역전사효소를 살모넬라 시스템에 보다 잘 국재시키기 위하여, 슈크로즈 구배를 이용하여 내막과 외막을 분리하고 이들 샘플을 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 웨스턴 블롯에서는, 재조합 pHAT 플라스미드를 함유하는 세포의 외막 분획에서만 단일 밴드가 가시적으로 나타났다. 따라서, 이러한 역전사효소 단백질이 약독화된 살모넬라의 외막에 국재된다.

재조합 역전사효소 플라스미드를 사용하는 경우와 같이, HIV tat 유전자를 갖는 pHAT 플라스미드를 함유하는 SL3261의 완전한 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 수행한다. 폴리클로날 항-tat 항체로 사용하여 이러한 웨스턴 블롯을 염색시킨다. 독특한 밴드가 pHAT 플라스미드를 함유하는 라인에서 관찰되었는데, 대조군 SL3261에서는 관찰되지 않았다. 이 밴드는 5.0kDa 주변에 걸쳐있는데, 이는 예상된 분자량 보다 더 높은 것이다.

플라스미드 pHAT를 함유하는 SL3261의 내막과 외막의 분리를 수행하여 재조합 tat를 추가로 국재시킨다. 웨스턴 블롯을 항-ompA 항체로 염색시키면, 독특한 밴드가 재조합 pHAT 플라스미드를 함유하는 SL3261의 외막 분획에 존재하였다. 이들 밴드는 상기 용합 작제물에 대해 예상된 것보다 더 높게 걸쳐 있는데, 약 50kDa의 분자량이다. pHAT 함유 SL3261과 대조군 SL3261 간에 명확한 차이가 관찰되었다. 이들 독특한 밴드는 항-tat 항체로 염색시킨 SL3261-pHAT의 완전한 세포 용해물의 웨스턴에서 관찰된 독특한 밴드와 동일한 분자량의 것인데, 이는 HIV tat 단백질이 이들 세포의 외막에 대해 국재한다는 것을 지시해준다. HIV 항원 역전사효소 및 tat가 이. 콜라이 및 약독화된 살모넬라 중의 이들 3조의 용합 작제물에서 발현되었다. 이러한 역전사효소와 tat 단백질 모두가 세균성 외막에 국재되었다.

플라스미드 pHAT 또는 pHAT을 함유하는 약독화된 살모넬라 균주 SL3261로 구성되는 상기와 같이 작제된 생 백신이 적당한 HIV 단백질을 발현하는 것으로 결정되지만 하면, 이들 세균을 이용하여 마우스에게 백신 접종한다. 2회 내지 3회 용량분을 경구 투여한 후, 상기 마우스를 대상으로 하여 적당한 HIV 항원에 대한 면역 반응에 대해 검정한다. 본 연구를 위해 경구적으로 백신 접종하는 방법을 선택한다. 마우스를 대상으로 하여 12주에 걸쳐 HIV 역전사효소 및 HIV tat에 대한 분비성 IgA 반응에 대해 검정한다. 이들 동일한 샘플을 대상으로 하여 또한, 분리된 비장 세포 상에서 증식 검정을 수행함으로써 헬퍼 T 세포 반응에 대해 검정한다.

상기와 같이 백신 접종된 마우스에서 측정된 역전사효소 특이적 IgA에서 IgA 수준차가 관찰되었다. SL3261-pHART로 백신 접종된 마우스만이 이러한 높은 수준의 역전사효소 특이적 IgA를 지니고 있다. tat 특이적 IgA의 SL3261-pHAT 생 백신 수준으로 백신 접종된 마우스에서는, 특이적 반응이 관찰되었다. 이들 결과는 양성이고 상기 백신이 유도성 HIV tat 특이적 IgA이라는 것을 지시해준다.

시간에 따라 SL3261-pHART 백신 접종된 마우스에서 수득된 역전사효소 특이적 IgA 반응에서는, 이러한 반응이 시간이 지남에 따라 떨어진다. 항원을 각 연속적 용량에서 점막으로 운반하기 위하여 상이한 약독화된 세균성 균주를 사용하는 것은 항체 반응의 저하를 없애거나 낮출 수 있다. 이와 같이 유용한 것으로 여겨지는 많은 약독화된 살모넬라 균주가 있다. 전반적으로, 역전사효소와 tat 백신 모두에 대해 수득된 결과는 양성인데, 이는 측정 가능한 수준의 항원 특이적 IgA가 상기와 같이 백신 접종된 마우스에게서 생성된다는 것을 지시해준다. 역전사효소 백신이 보다 높은 수준의 분비성 IgA 항체를 유도하는데 있어서 더 효과적이다.

2가지 상이한 검정을 이용하여 HIV 항원에 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 측정한다. 첫번째 백신 접종한 지 3주 후에 이들 SL3261-pHART 백신 접종시킨 마우스에서 역전사효소 특이적 반응이 나타났다.

역전사효소 백신으로 초기 백신 접종시킨지 12주 후에 수행된 증식 검정에서는, 상이한 마우스로부터 분리된 비장 세포에서 관찰된 반응이 보다 뚜렷하다. 역전사효소 작제물을 함유하는 SL3261로 백신 접종한 5마리 마우스 중에서 4마리는 비장 세포를 자극하기 위해 사용된 역전사효소 항원의 두 농도에 대해 양성 반응을 나타낸다. 5마리 마우스 모두는 비장 세포를 자극하기 위해 사용된 열-사멸된 살모넬라에 대해 양성 반응을 나타낸다. 이러한 결과는 HIV 역전사효소 항원을 발현시키는 생 백신으로 백신 접종되는 경우에는 이들 마우스가 역전사효소에 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 발현한다는 것을 지시해준다. SL3261-pHART 생 백신으로 백신 접종시킨 마우스에서 관찰된 양성 헬퍼 T 세포 반응은 역전사효소 특이

적-IgA 반응을 사용하여 수득된 양성 결과와 함께, 이러한 백신 접종 방법이 유용하다는 것을 지시해준다.

본 발명은 특이적 HIV 항원을 약독화된 살모넬라 균주 상에 표면 발현시킴으로써 HIV에 대한 생 백신용 모델에 관한 것이다. 이러한 백신은 점막성 IgA 반응과 HIV 역전사효소 항원에 특이적인 헬퍼 T 세포 반응을 유발시킨다. 약독화된 살모넬라 균주와 같은 생 백신 벡터는 투여하기가 용이하고 특정한 조작이나 주사를 요구하지 않는다. 환자에게 매일 용량을 공급할 수 있다. 이차적으로는, 이러한 백신은 비용이 저렴하다.

HIV 역전사효소 및 tat와 같은 단백질을 표시하기 위하여 이러한 표면 발현 방법을 사용하는 것 이외에도, 에피토프 또는 펩티드를 면역을 자극하는데 사용할 수 있다. 이러한 작제물에서는, 면역원성 펩티드에 대한 염기쌍 서열이 lpp-ompA 서열 다음에 올 것이므로, 에피토프가 표면 표시된다. 면역 반응을 자극하는 것으로 공지된 이러한 특이적 에피토프는 살모넬라의 보조약 특성으로 인해 보다 강력한 면역을 유발할 것이다. 전체 단백질과는 반대로, 단지 특정 펩티드를 사용하는 이러한 방법으로 인해, 세균 생존율과 플라스미드 안정성이 증가할 수 있는데, 이는 이러한 표면 발현에서 막 파괴가 덜하기 때문이다. 이러한 펩티드의 한 예가 사람과 C3H/HeJ 마우스 모두에서 T 세포 에피토프인 것으로 공지되는 항원성 역전사효소 펩티드이다[참조: Hosmalin, 1990].

HIV에 대한 생 백신 작제를 위해 lpp-ompA 융합 작제물을 사용하여 약독화된 살모넬라 균주 SL3261에서 HIV 단백질을 표면 발현시키는 기술을 또한, 기타 바이러스성 및 세균성 병원체에 적용할 수 있다. 이러한 백신을 발현시킬 수 있는 또 다른 바이러스의 한 예가 서방 세계에서 1세 영아 입원의 주 원인인 호흡기 합포체성 바이러스(RSV)이다. RSV로부터 유용한 항원은 F 단백질인데, 이는 SL3261에서 상기 lpp-ompA 시스템을 사용하여 표면 발현시킬 수 있다. 이러한 재조합 세균을 RSV에 대한 생 백신으로서 사용할 수 있다. 기타 바이러스성 및 세균성 백신을, 상기 lpp-ompA 융합 작제물을 사용하여 SL3261에서 병원체-특이적 항원을 표면 발현시킴으로써 개발할 수 있다.

다음 참조문헌이 본원에 인용된다:

- Brown, A., et al., *J. of Infectious Diseases* **155** (1): 86-92, (1987).
- Levine, M. M., et al., *J. of Clinical Investigation* **79**: 888-902, (1987).
- Sadoff, J. C., et al., *Science* **240**: 336-338, (1988).
- Dougan, G., et al., *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* **33**: 271-300, (1989).
- Newton, S., et al., *Science* **244**: 70-72, (1989).
- Fairweather, et al., *Infection and Immunity* **58** (5): 1323-26, (1990).
- Franchini, et al., *International Conference on AIDS* **7** (1): 101, (1991).
- Charbit, A., et al., *Vaccine* **11** (2): 1221-8, (1993).
- Berggren, R. E., et al., *J. of Acquired Immunodeficiency Syndromes and Human Retrovirology* **10**: 489-95, (1995).
- Haynes, B. F. *Lancet* **348**: 933-37, (1996).
- Sullivan, N., et al., *J. of Virology* **69** (7): 4413-22, (1995).
- Wei, X., et al., *Nature* **373**: 117-22, (1995).
- Ho, D. D., et al., *Nature* **373**: 102, (1995).
- Daniel, M. D., et al., *Science* **258**: 1938-41, (1992).

- Stott, E. J., *Nature* **353** : 393, (1991).
- Haynes, B. F., *Science* **260**: 1279-85, (1993)
- Clements, J., et al., *Infection and Immunity* **53** (6): 685-92, (1986).
- Service, R. F., et al., *Science* **265**: 1522-24, (1995).
- Clements, J. D., et al., *Nature Biotechnology* **15**: 622-23, (1997).
- Staats, H. F., et al., *J. of Immunology* **157**: 462-72, (1996).
- Charbit, A., et al., *AIDS* **4** : 545-551, (1990).
- Hale, T. L., et al., *Research in Microbiology* **141**: 913-19, (1990).
- O'Callaghan, D., et al., *Research in Microbiology* **141** : 963-69, (1990).
- Tagliabue, et al., *Clinical Experimental Immunology* **62**: 242-47, (1985).
- Bacon, et al., *British J. of Experimental Pathology* **32**: 714-24, (1950).
- Germanier, R., et al., *Infectious Immunity* **4**: 663-673, (1971).
- Germanier, R., et al., *J. of Infectious Diseases* **131**: 553-8, (1975).
- Hoiseth, S., et al., *Nature* **291**: 238-9, (1981).
- Curtiss ,et al., *Vaccines; New Concepts and Developments* :261, (1987).
- Curtiss III, R., et al., *Infectious Immunity* **55**: 3035-43, (1987).
- McFarland, W., et al., *Microbial Pathogen* **3**:129-41, (1987).
- Ohta, M., et al., *Microbiological Immunology* **31**: 1259-65, (1987).
- Robertsson, J., et al., *Infectious Immunity* **41**: 742-50, (1983).
- Killar, L. M., et al., *Infectious Immunity* **47**: 605-12, (1985).
- Emini, E. A., et al., *Journal of Virology* **64**: 3647, (1990).
- Salk, J., et al., *Science* **260**: 1270-72, (1993).
- Clerici, M., *J. of the American Medical Association* **271**: 42, (1994).
- Plummer, F. A., et al., *International Conference on AIDS* **9**: 23, (1993).
- Kraehenbuhl, et al., *Physiological Reviews* **72** (4): 853-73, (1992).

- Curtiss III, R., et al., *Current Topics in Microbiology and Immunology* **146**: 35-49, (1989).
- Levy, E., et al., *Arb Kaiser Gesundh* **28**: 168-71, (1908).
- Muller, M., *Centrobblatt Bakteriologie Parasitenkunde* **62**: 335-73, (1912).
- Gaines, S., et al., *J. of Infectious Diseases* **118**: 293-306, (1968).
- Curtiss III, et al., *The Secretory Immune System* **409**: 688, (1983).
- Curtiss III, R., et al., *Molecular and Microbiology and Immunology of Streptococcus mutants* p: 173, (1986).
- Curtiss III, R., *Current Topics in Microbial Immunology* **118**: 253-77, (1985).
- Curtiss III, R., *J. of Dental Research* **65**: 1034-45, (1986).
- Dougan, G., et al., *Infectious Immunity* **52**: 344-47, (1986).
- Maskell, D., et al, *Vaccines 86: New Approaches to Immunization Developing Vaccines Against Parasitic Bacterial and Viral Diseases* p. 213, (1986).
- Cryz Jr., et al., *Infection and Immunity* **63** (4): 1336-39, (1995).
- Strugnell, R. A., et al., *Gene* **88**: 57-63, (1990).
- Levine, M. M., et al., *Research in Microbiology* **141**: 807-816, (1990).
- Francisco, J. A., et al., *PNAS, USA* **89**: 2713-17, (1992).
- Sabin, A. B., *PNAS, USA* **89**: 8852-55, (1992).
- Blazevic, V., et al., *J. of Acquired Immuno deficiency Syndromes* **6**: 881-90, (1993).
- Li, C. J., et al., *Science* **268**: 429-431, (1995).
- Walker, B. D., et al., *Science* **240**: 64-66, (1988).
- Francisco, J. A., et al., *Bio/Technology* **11**: 491-5, (1993).
- Charles, I., et al., *Trends in Biotechnology* **8**: 117-121, (1990).
- Clements, J. D., et al., *Infectious Immunity* **46**: 564-569, (1984).
- Curtiss, R., III, et al., *Vaccine* **6**: 155-160, (1988).

- Dougan, G., et al., *Semin. Virology*, **1**: 29-37, (1990).
- Hilleman, M. R., *Antibiotic Chemotherapy* **48**: 161-172, (1996).
- Hone, D., et al., *Microbial Pathology* **5**: 407-418, (1988).
- Johnston, M. I., *Hospital Practice* : 125-140, (1997).
- Letvin, N. L., *The New England J. of Medicine* **329** (19): 1400-1405, (1993).
- Maskell, D., et al., *Microbial Pathology* **2**: 211-221, (1987).
- O'Callaghan, et al., *FEMS Microbiological Letters* **52**: 269-274, (1988).
- Poirier, et al., *Journal of Experimental Medicine* **168**: 25-32, (1988).
- Schultz, A. M., *Advances in Experimental Medicine and Biology* **397**: 79-90, (1996).
- Stevenson, et al., *FEMS Microbiological Letters* **28**: 317-321, (1985)
- Stott, E. J., et al., *J. of Antimicrobial Chemotherapy* **37** supp. B: 185-198, (1996).
- Tarkka, E., et al., *Microbial Pathology* **6**: 327-335, (1989).
- Taylor, D. W., et al., *Parasitology* **91**: S73-S81, (1986).
- Traumont, E. C., et al., *J. of Infectious Diseases* **149**: 133-139, (1984).
- Whadan, M. H., et al., *J. of Infectious Diseases* **145**: 292-96, (1982).
- Stover, C. K., et al., *Nature*, **351**: 456-60, (1991).
- Mukkur, et al., *J. of Medical Microbiology* **24**: 11-19, (1987).
- Hone, D., et al., *J. of Infectious Diseases* **156**: 167-74, (1987).
- Clerici, M., et al., *J. of Clinical Investigation* **91** (3): 759-65, (1993).
- Dougan, G., et al., *Parasite Immunology* **9**: 151-160, (1987).
- Dougan, et al., *J. of Infectious Diseases* **158**: 1329-1335, (1988).
- Hahn, B. H., et al., *PNAS, USA* **82** (14): 4813-7, (1985).
- Clavel, F., et al., *Science* **233**: 343-6, (1986).
- Guyader, M., et al., *Nature* **326**: 662-9, (1987).
- Rowland-Jones, S., et al., *Nature Medicine* **1** (1): 59-64, (1995).
- Clerici, M., et al., *J. of Infectious Diseases* **165**: 1012-19, (1992).
- De Bruijn, et al., *European J. of Immunology* **25**: 1274-85, (1995).
- Stryhn, A., et al., *European J. of Immunology* **24**: 1404-09, (1994).
- Reis e Sousa, et al., *J. of Exper. Medicine* **182**: 841-51, (1995).
- Kovacsovics-Bankowski, M., et al., *PNAS, USA* **90**: 4942-46, (1993).
- Harding, C. V., et al., *J. of Immunology* **153**: 4925-33, (1994).
- Hosmalin, A., et al., *PNAS, USA* **87**: 2344-48, (1990).
- Stott, E.J., et al., *Archives of Virology* **84**: 1-52, (1985)

본 명세서에 언급된 모든 특허 또는 공보는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련인의 수준을 나타내는 것이다. 추가로, 이들 특허 및 공보는 각각의 개별적인 공보가 구체적이고도 개별적으로 참조문헌으로써